

**FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA**

**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL *Vaccinium floribundum* KUNTH. “PUSHGAY”  
DE LA REGIÓN CAJAMARCA MEDIANTE MARCADORES MOLECULARES RAPD**

**Línea de Investigación:**

**Genética, Bioquímica y Biotecnología**

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE LICENCIADA EN BIOLOGÍA**

**AUTOR**

Huamani Moreano, Nila Edit

**ASESOR (A)**

Asesor Interno: Mg. Scotto Espinoza, Carlos

Asesor Externo: Dra. Gutiérrez Rosati, Antonietta Ornella

**JURADO:**

Dr. IANNACONE OLIVER, José Alberto

Mg. RODRIGO ROJAS, María Elena

Mg. VELARDE VÍLCHEZ, Mónica Margarita

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco el apoyo incondicional de mis padres, Pedro y Sabina, así como el de mis hermanos Susan y David. Agradezco también el empuje y apoyo de la Dra. Antonietta Gutiérrez, por la confianza depositada y permitir incorporarme al grupo de investigación para realizar el proyecto llamado “Domesticación de Berries Nativos de Cajamarca, relacionados al arándano, mediante el uso de herramientas biotecnológicas” financiado por el INIA, PNIA, contrato N° 009-2016-INIA-PNIA-UPMSI-IE, desarrollado en Centro de Investigación en Recursos Genéticos, Biotecnología y Bioseguridad (CIRGEBB), laboratorio ubicado en la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Agraria La Molina.

Estoy agradecida con el profesor Mg. Carlos Scotto, Jefe del Laboratorio de Mejora Genética y Reproducción Animal de la Facultad de Ciencias Naturales y Matemática de la Universidad Nacional Federico Villarreal, quien me ha brindado los consejos y recomendaciones necesarios durante la realización de mi tesis, así como el asesoramiento requerido para culminar el trabajo de tesis.

## ÍNDICE

I.	INTRODUCCIÓN.....	7
1.1	DESCRIPCIÓN Y FORMULACIÓN DEL PROBLEMA.....	7
1.2	ANTECEDENTES.....	8
1.3	OBJETIVOS.....	13
1.3.1	OBJETIVO GENERAL.....	13
1.3.2	OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	13
1.4	JUSTIFICACIÓN.....	13
1.5	HIPÓTESIS.....	14
II.	MARCO TEÓRICO.....	15
2.1.	BASES TEÓRICAS SOBRE EL TEMA DE LA INVESTIGACIÓN.....	15
III.	MÉTODO.....	18
3.1	TIPO DE INVESTIGACIÓN.....	18
3.2	ÁMBITO TEMPORAL Y ESPACIAL.....	18
3.3	VARIABLES.....	19
3.4	POBLACIÓN Y MUESTRA.....	19
3.5	INSTRUMENTOS.....	20
3.5.1	EQUIPOS:.....	20
3.5.2	SOLUCIONES Y REACTIVOS:.....	21
3.6	PROCEDIMIENTO.....	22
3.6.1	EXTRACCIÓN DE ADN.....	22
3.6.2	EVALUACIÓN DE CALIDAD Y CONCENTRACIÓN DE ADN.....	23
3.6.3	VALIDACIÓN DEL ADN.....	24
3.6.4	ESTANDARIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE PCR.....	24
3.6.5	ANÁLISIS DE PRIMERS RAPDS.....	26
3.6.6	ELECTROFORESIS DE AMPLICONES EN GEL DE AGAROSA.....	27
3.7	ANÁLISIS DE DATOS.....	27
3.8	CONSIDERACIONES ÉTICAS.....	28
IV.	RESULTADOS.....	29
4.1	ANÁLISIS GENERAL DE TRES PRIMERS.....	49
4.2	ANÁLISIS DE DIVERSIDAD GÉNICA INTRAPOBLACIONALES.....	51
4.3	ANÁLISIS DE DIVERSIDAD GENÉTICA A NIVEL POBLACIONES INDIVIDUALES.....	53
4.4	ANÁLISIS DE DIVERSIDAD GENÉTICA A NIVEL MÚLTIPLES POBLACIONES.....	56
4.5	ANÁLISIS DE DIVERSIDAD Y DIFERENCIACIÓN GENÉTICA ENTRE POBLACIONES.....	60
4.6	ANÁLISIS DE IDENTIDAD GENÉTICA Y DISTANCIA GENÉTICA.....	64

4.7	ANÁLISIS DE AGRUPAMIENTO.....	66
V.	DISCUSIÓN DE RESULTADOS .....	68
VI.	CONCLUSIONES .....	71
VII.	RECOMENDACIONES .....	72
VIII.	REFERENCIAS.....	73
IX.	ANEXOS .....	77

## RESUMEN

*Vaccinium floribundum* Kunth "Pushgay" es una baya nativa del Perú que puede convertirse en un cultivo altamente rentable, por su característica de ser nutracéutico, para los pobladores y emprendedores de la localidad de Cajamarca, debido a su gran sabor y beneficios potenciales en la salud. Sin embargo, el conocimiento limitado de su genoma es una limitante en el desarrollo de selección asistida en los programas de mejoramiento que puedan ejecutarse a futuro. Con el objetivo de conocer la diversidad genética de esta notable baya silvestre, el presente estudio identificó marcadores RAPD que amplificaron patrones de alélicos y que fueron considerados polimórficos.

De los 3 cebadores evaluados, se produjeron un total de 28 bandas de los cuales solo 23 (82.14 %) fueron consideradas polimórficas. Estas fueron seleccionadas para análisis adicionales de diversidad genética en 46 ecotipos colectados en la región Cajamarca. Como resultado se determinó el Índice de Diversidad Genética (Nei's 1973) para el total de muestras, en promedio fue de 0.2131, lo cual indicaría una moderada variabilidad genética para los ecotipos colectados de la región Cajamarca.

(Palabras clave): nutracéutico, genoma, polimórfico, ecotipo.

## ABSTRACT

*Vaccinium floribundum* Kunth "Pushgay" is a native berry of Peru that can become a highly profitable crop, due to its characteristic of being nutraceutical, for the residents and entrepreneurs of the town of Cajamarca, due to its great taste and potential health benefits. However, limited knowledge of its genome is a limitation in the development of assisted selection in breeding programs that may be implemented in the future. With the objective of knowing the genetic diversity of this remarkable wild berry, the present study identified RAPD markers that amplified allelic patterns and were considered polymorphic.

Of the 3 primers evaluated, a total of 28 bands were produced, of which only 23 (82.14%) were considered polymorphic. These were selected for additional analyzes of genetic diversity in 46 ecotypes collected in the Cajamarca region. As a result, the Genetic Diversity Index (Nei's 1973) was determined for the total samples, on average it was 0.2131, which would indicate a moderate genetic variability for the ecotypes collected from the Cajamarca region.

(Keywords): nutraceutical, genome, polymorphic, ecotype.

## I.INTRODUCCIÓN

### 1.1 DESCRIPCIÓN Y FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

Perú presenta especies endémicas del género *Vaccinium* y muchas otras, que crecen en nuestros particulares climas, que aún no han sido estudiadas, pero son consumidas y/o utilizadas por el poblador local como alimento o medicina (López *et al.* 2014).

El “Pushgay” es un arbusto silvestre que crece en laderas empinadas de la zona agroecológica Quechua alta y Jalca, tiene por fruto, pequeñas bayas redondas comestibles de color azul-violáceo (Tapia y Fries, 2007), ésta es una especie nativa valiosa y notablemente importante para las familias locales.

La información que se conoce es limitada y el poblador local sólo conoce los rasgos morfológicos. El género *Vaccinium* es caracterizado por su alta variabilidad y puede ser analizado basado en características morfológicas, sin embargo, estas pueden ser influenciadas por las condiciones ambientales (Debnath, 2014).

Si bien se han realizado estudios botánicos previos sobre esta especie, no se conoce aún la diversidad genética intraespecífica, y es de importancia disponer de una estimación de dicha variabilidad. Los marcadores RAPDs han sido usados para análisis de diversidad en el género *Vaccinium* (Debnath, 2005).

La presente investigación realiza un estudio de la diversidad genética del “Pushgay” mediante el uso de marcadores moleculares de Random Amplification of Polymorphic DNA (RAPD, por sus siglas en inglés) basados en el análisis de ADN y obtenidos por un tipo reacción de PCR, en el que los segmentos de DNA amplificados son aleatorios), con la finalidad de estimar la diversidad genética de esta especie, a fin de consolidar la información y que pueda ésta ser utilizada para futuras investigaciones que ayuden y fomenten el potencial uso de esta valiosa baya.

## 1.2 ANTECEDENTES

El género *Vaccinium*, ubicado dentro del orden Ericales, familia Ericaceae (APG IV, 2016 / Cole, Hilger, Stevens y Medan, 2019) es un género tan grande, que es taxonómicamente complejo (Cobo, 2014). Sleumer, en 1941 dividió el género en 33 secciones basadas en la filogenética a partir de características morfológicas. Sin embargo, Kron *et al.* (2002) no de acuerdo con la idea, indicaron que muchos de los indicadores utilizados tradicionalmente para delimitar géneros (Flores, frutos, semillas y partes vegetativas) no distinguen adecuadamente entre taxones.

Boches *et al.* (2006) dijeron que *Vaccinium* (familia Ericaceae) es un género de plantas extensamente distribuido, encontrándose en todos los continentes excepto Australia y Antártica y que exhiben altos niveles de diversidad morfológica.

Una investigación en el Perú hecha por López *et al.* (2014) menciona acerca de un registro del género *Vaccinium* en el norte del Perú basado en la revisión de libros, folletos científicos, así como de trabajos de investigación y visitas a Herbarios, en los que concluye el registro de 10 especies de este género. De las cuales 6 son endémicas, no habiendo registrado a *Vaccinium floribundum* como endémico.

Tapia y Fries (2007) describieron al “Pushgay” como un arbusto rastrero con abundantes ramas y con hojas pequeñas y redondas. Sus flores son de color blanco al inicio y se van tornando moradas cuando va a empezar la fructificación. Los frutos son bayas pequeñas, redondas que están dispuesta en racimos, las bayas a la madurez son de color azul-violáceo, y se le conoce con el nombre común “uva del monte”, “uva del campo” o simplemente “uvitas”. Indica también la presencia de 4 variedades comestibles que se caracterizan por el color de piel, pulpa y por el tamaño. Asimismo, la existencia de una variedad toxica conocida por el nombre de “mío mío”.

Vasco y colaboradores (2009) efectuaron un estudio sobre los compuestos fenólicos de los frutos de *Vaccinium floribundum* Kunth, de la familia Ericaceae de los páramos de Ecuador, conocido como “mortiño”, estudiados mediante el método



de caracterización fenólica denominado LC-DAD-MS / MS, por primera vez. Encontraron epicatequina, un dímero A y un trímero A. De los flavonol glucósidos, la quercetina y la miricetina se encontraron como -3-O-hexósidos, -3-Opentosides y -3-O-desoxihexósidos. Los ácidos clorogénicos y neochlorogénicos junto con los derivados de ácido cafeico / ferúlico se encontraron como componentes predominantes entre los ácidos hidroxicinámicos en la baya. Así como también antocianinas, incluidos los derivados de cianidina y delphinidina, fueron la principal clase de compuesto fenólico cuantificada.

Medina y colaboradores en el año 2015 publicaron un estudio acerca del efecto hepatoprotector del *Vaccinium floribundum* HBK "Pushgay" frente al estrés oxidativo inducido con tetracloruro de carbono, obteniendo resultados muy positivos. Se determinó que el grupo tratado con tetracloruro de carbono más el extracto hidroalcohólico a 600 mg·Kg<sup>-1</sup> de peso corporal, disminuyó notablemente la cantidad de radicales libres y favoreció la rápida regeneración hepática.

Según Seminario (2004) el número de cromosomas y el nivel de ploidía son datos útiles en el estudio de una especie y en la caracterización del germoplasma. Pueden mostrar las relaciones existentes entre especies dentro de un género o familia y clarificar el origen de los híbridos naturales y variedades cultivadas. En algunas especies, las células somáticas presentan más de dos juegos de cromosomas, recibiendo el nombre de poliploides. La poliploidización es un proceso, no un evento (DeWet, 1981), y se constituye como el rasgo más conspicuo de la evolución cromosómica en las plantas superiores (Stebbins, 1971).

El género *Vaccinium* presenta un nivel de ploidía que va desde Diploide a hexaploide ( $2n=2x=24$ ;  $2n=3x=36$ ;  $2n=4x=48$ ;  $2n=6x=72$ ). Como, por ejemplo, los cultivos de arándano norteño (*Vaccinium corymbosum* L.), son tetraploides ( $2n = 4x = 48$ ). (GDV (s.f)).

Según Jiménez y Collada (2000) La variación intraespecífica es un requisito para la evolución, al ofrecer la posibilidad de diferentes respuestas a las fuerzas selectivas debido a que los individuos no son idénticos entre sí. Dada la importancia

en el conocimiento de la variabilidad de la especie se ha buscado disponer de una estimación, Con ese fin se utilizan varios enfoques. Los caracteres fenotípicos resultan de fácil observación, pero están muy influenciados por el ambiente y su control genético es poco claro. Los marcadores moleculares permiten estudiar directamente el material genético, pero normalmente se trata de rasgos sin reflejo en el fenotipo.

Según Cornide (2000) los marcadores moleculares, al estar relacionados a una característica específica son de particular interés porque permiten identificar individuos que contengan esa característica y diferenciarlos de los que no la posean, es decir que dan información sobre la diversidad genética. Respaldando la posición de Velasco Mosquera R. en 2005 indicando que los marcadores moleculares o marcadores de ADN revelan sitios de variación naturales a nivel de secuencia de ADN. Y la mayoría de ellos se clasifican en 2 categorías de técnicas: las que se basan en la hibridación con sondas marcadas o aquellas que se basan en la Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR). Las técnicas basadas en la PCR son RAPDs, SSRs, PCR-RFLP y AFLPs. La principal diferencia entre las técnicas mencionadas radica en los cebadores que se emplean, los que puede ser de 3 tipos: específicos, semiespecíficos y arbitrarios.

Los marcadores de ADN que han sido usados para análisis de diversidad en el género *Vaccinium* (Debnath, 2005) son: Polimorfismos en la Longitud de fragmentos de restricción (RFLP, por sus siglas en inglés) fue el primer marcador usado por Haghghi y Hancock en 1992. Albert *et al.* (2003) empleó marcadores RAPD y AFLP, Rowland *et al.* (2003) evaluó la idoneidad del marcador Expressed Sequence Tags (ESTs-PCR, por sus siglas en inglés), mientras que Wang *et al.* (1994) and Debnath (2007) aplicaron marcadores Inter Simple Sequence Repeats (ISSR, por sus siglas en inglés).

Los Polimorfismos de ADN amplificados al azar mediante el uso de RAPD son parte de la categoría de marcadores establecidos en la PCR usando un único cebador corto y de secuencia arbitraria con lo cual amplifica cualquier región del genoma, flanqueada por secuencias complementarias al cebador. El número de fragmentos obtenidos es independiente de la complejidad del genoma y se

distribuyen arbitrariamente en él. En el laboratorio requiere del aislamiento de ADN seguido de una PCR con un cebador finalizando con la separación de los fragmentos mediante electroforesis para ser visualizados (Bardakci, 2001).

Esta técnica tiene un sinnúmero de beneficios: no es necesario tener un conocimiento previo de la secuencia de ADN; tampoco requiere la construcción o el mantenimiento de una librería genómica y el número de loci que puede ser examinado es ilimitado. Otro beneficio de los RAPD es que amplifican regiones codificantes del ADN como las no codificantes y revelan niveles de variación más altos comparándolo con otros marcadores (Ferreira y Grattapaglia, 1998).

Polimorfismos RAPDs se heredan de forma mendeliana y pueden emplearse para construir mapas genéticos. La ventaja de esta técnica es que permite manejar cebadores universales, son económicos y sencillos. Sin embargo, la desventaja radica en los problemas de reproducibilidad, homoplasia en bandas, información limitada por la naturaleza dominante, no se pueden diferenciar genotipos heterocigotos de homocigoto y locus reducido a 1 solo alelo.

El uso de los marcadores genéticos se inicia con el desarrollo y generación de la Polymerase Chain Reaction (PCR, por sus siglas en inglés) (Mullis *et al.*, 1986).

Kron *et al.*, 2002 realizaron el primer estudio, en abordar las relaciones filogenéticas entre los miembros de la familia Vaccinieae en todo el mundo, sus resultados indicaron que el gran género *Vaccinium* no es monofilético, pero probablemente representa un grupo de grado del cual evolucionaron varios clados más especializados. Para su estudio analizó datos de secuencia del gen chloroplast *matK* y la región *nrITS* para 93 especies de Vaccinieae, que representan 28 géneros, y 16 secciones (de las 33 antiguamente reconocidas) de *Vaccinium*.

Investigación realizada por Roldan en 2012 sobre la caracterización molecular, funcional y estudio del comportamiento post cosecha del “mortiño”

(*Vaccinium floribundum* Kunth) de la comunidad de Quinticusig del Cantón Sigchos de la provincia de Cotopaxi, destacó la aplicación de la técnica de los microsatélites o secuencias simples repetidas (SSR) y probó la transferibilidad de 15 primers SSRs utilizados previamente en la caracterización de *Vaccinium myrtilus*, de los cuales solo 8 primers microsatélites resultaron ser transferibles al ADN de *Vaccinium floribundum*, 3 de los cuales presentaron polimorfismo genético en el germoplasma analizado.

Posteriormente Cobo en 2014, realiza un estudio para evaluar la diversidad genética de “mortiño” (*Vaccinium floribundum* Kunth.) proveniente de los páramos de Ecuador concluyendo en el análisis de variación molecular, que el 85% de la diversidad genética corresponde a la variabilidad intrapoblacional y 14% corresponde a la variabilidad interpoblacional. Este autor sugiere también utilizar secuencias de regiones de ADN nuclear, de regiones microsatélites, de ADN mitocondrial o de ADN de cloroplastos, para realizar comparaciones con bases de datos de especies cercanas andinas y poder detectar la presencia de aislamiento por elevación y por distancia.

Sobre la técnica basada en el análisis de ADN obtenidos mediante RAPDs podemos indicar que ésta representa una importante herramienta biotecnológica que permite estudiar directamente el material genético con la finalidad de poder analizar la diversidad genética del “Pushgay”, la técnica presenta un amplio número de beneficios ya descritos a los que debe considerarse que ésta pueda ser realizada con las facilidades de equipos e infraestructura del laboratorio en el cual se ejecuta la investigación, pese a ser conocedores de la discutible reproducibilidad de los patrones de banda, sin embargo valoramos enormemente los avances que podemos lograr con los análisis RAPDs, los cuales deben considerar la optimización de todos los parámetros experimentales para asegurar reproducibilidad de los patrones de bandas. Se espera asimismo sentar bases para estudios futuros que complementen y consoliden el conocimiento molecular de la especie.

### 1.3 OBJETIVOS

#### 1.3.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar la diversidad genética del “Pushgay” (*Vaccinium floribundum* Kunth.) ecotipos colectados en la región Cajamarca mediante la estimación de la variabilidad intraespecífica, empleando marcadores moleculares basados en el análisis de ADN (RAPDs).

#### 1.3.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

Determinar y establecer el grado el polimorfismo del “Pushgay” (*Vaccinium floribundum* Kunth.) entre individuos de la misma población y de diferentes localidades.

Estandarizar las reacciones y condiciones de PCR para la amplificación de marcadores RAPD

Identificar marcadores con alta capacidad para discriminar los ecotipos de “Pushgay”.

### 1.4 JUSTIFICACIÓN

El “Pushgay” es un frutal silvestre que se caracteriza por ser un arbusto, con crecimiento determinado o rastrero, presenta bayas pequeñas y redondas dispuestas en racimos, son de color azul- violáceo. Su hábitat se encuentra entre las zonas agroecológicas quechua alta y jalca, en la sierra norte en altitudes que van desde los 2350 a los 3500msnm; se encuentra presente en varias regiones de Perú (Tapia y Fries, 2007).

Debido a su naturaleza estacional no permite una oferta continua de frutos para su transformación, ésta es limitada. Dado que ya existen estudios botánicos y ecológicos. Sin embargo, la información genética “sigue siendo limitada”.

Por estas razones, la determinación de la diversidad genética del “Pushgay” (*Vaccinium floribundum* Kunth) es de vital importancia. El presente estudio permitirá

conocer la distribución de diversidad genética de la especie y los aspectos de estructura y variabilidad genética de la especie.

Los datos obtenidos se podrían aplicar en futuras investigaciones relacionadas a su evolución y diferenciación de poblaciones, así como para propósitos prácticos de cría a fin de obtener cultivos mejorados con características deseadas, en orden de consolidar el conocimiento sobre el potencial uso y manejo de esta planta silvestre en beneficio del poblador local.

## **1.5 HIPÓTESIS**

En la población de "Pushgay" de Cajamarca habría una alta variabilidad genética y se podrá estimar dicha variabilidad genética mediante marcadores RAPD en matrices de presencia y ausencia, empleando Coeficientes de Similitud o Disimilitud Genética y Análisis Clúster.

En la Población de "Pushgay" de Cajamarca no habría una alta variabilidad genética y no se podrá estimar la variabilidad genética mediante marcadores RAPD en matrices de presencia y ausencia empleando Coeficientes de Similitud o Disimilitud Genética y Análisis Clúster.

## II. MARCO TEÓRICO

### 2.1. BASES TEÓRICAS SOBRE EL TEMA DE LA INVESTIGACIÓN

El “**Pushgay**” *Vaccinium floribundum* Kunth. es un arbusto rastrero, perenne, longevo, miden de 30 cm hasta 2 metros de altura. La inflorescencia se presenta en racimos de 6 a 10 flores, miden hasta 1,5 cm de largo. Las flores son pendulares de hasta 8 mm de largo, la corola es cilíndrica con 4 o 5 dientes obtusos, de color blanco al inicio y se tornan moradas cuando va a empezar la fructificación. Los frutos son bayas pequeñas redondas que están dispuestas en racimos, son de color azul-violáceo y su jugo es de color púrpura, a veces con una cubierta cerosa y su jugo es de color púrpura. Es perenne y empieza a florecer con el inicio de épocas de lluvia (Tapia y Fries, 2007).

**Las relaciones Intraespecíficas** se establecen entre individuos que corresponde dentro de una misma población. Dada la importancia en el conocimiento de la variabilidad de la especie se ha buscado disponer de una estimación, con ese fin se utilizan varios enfoque. Los caracteres fenotípicos resultan de fácil observación, pero están influenciados por el ambiente y su control genético es poco claro (Jiménez y Collada, 2000). A diferencia de los marcadores controlados por genes asociados a caracteres morfológicos (fenotipos de fácil identificación visual), las variaciones en los marcadores de ADN, no se muestran por sí mismas en el Fenotipo, porque pueden ser diferencias en un solo nucleótido del gen o en un pedazo de ADN repetitivo (Velasco, 2005).

**Los marcadores moleculares** al estar relacionados a una característica específica, dan información sobre la diversidad genética y esto es esencial en el campo de la Biología tanto aplicada como fundamental: Ecología, Biología de la Evolución, Taxonomía, Agronomía, Biotecnología, Microbiología, Genética, etc. (Cornide, 2000).

El uso de los marcadores genéticos se inicia con el desarrollo y generación de la técnica de biología molecular, **la Reacción en Cadena de la Polimerasa** (Mullis *et al.* 1986). La técnica sintetiza varias veces un pedazo o fragmento de ADN

utilizando una polimerasa que puede trabajar a temperaturas muy elevadas, ya que proviene de la bacteria *Thermus aquaticus*, que vive a altas temperaturas, de donde toma su nombre comercial más conocido: taq polimerasa. La reacción de PCR simula lo que sucede en una célula cuando se sintetiza el ADN, en un tubo especial se mezclan todos los ingredientes necesarios: la enzima polimerasa, el ADN del organismo que se desea estudiar, oligonucleótidos necesarios para que inicie la transcripción (llamados también primers o iniciadores), dinucleótidos (dNTP's) y las condiciones para que la enzima trabaje adecuadamente (pH, cantidades de MgCl<sub>2</sub>, KCl) (Arteaga, 2017).

**RAPD** (Amplificación aleatoria de ADN polimórfico) es una técnica que consiste en la amplificación aleatoria de segmentos de ADN con iniciadores pequeños (10 nucleótidos de longitud) de secuencias aleatorias no-palindrómicas, con un contenido de G+C entre los 50 y 80%. (Williams *et al.* 2000). La técnica se basa en la probabilidad estadística de que se presenten sitios complementarios al oligonucleótido o primer de 10 pares de bases a lo largo del genoma. Estos marcadores son dominantes, es decir, no pueden distinguir entre homócigos dominantes de heterócigos para un segmento en particular, por lo que la estimación de las frecuencias alélicas se debe hacer de manera indirecta, asumiendo equilibrio de Hardy-Weinberg, cuando la distribución de frecuencias genotípicas y alélicas permanecen invariables en el tiempo (Arteaga, 2017).

Detectan amplios grados de polimorfismo, por lo que una de sus mejores aplicaciones es la identificación genética de individuos. Otra aplicación paralela es la detección de uniformidad genética con un marcador eficiente y rápido. Además, entre las principales ventajas de los RAPD's está que amplifican regiones tanto codificantes del ADN como las no codificantes y revelan niveles de variación más altos que los RFLP's e isoenzimas. Es una técnica relativamente fácil que no necesita conocimiento previo de la secuencia de ADN, no requiere la construcción o el mantenimiento de una librería genómica, el número de loci que puede ser examinado es ilimitado y no requiere pruebas radiactivas. Los RAPD's generan un número inmenso de marcadores y, al contrario de los RFLP's, no requieren de sondas específicas para cada especie y la cantidad de ADN necesaria para el análisis es mucho menor (Arteaga, 2017).



Sin embargo, en la práctica los problemas principales detectados en los RAPD's son: presencia de bandas "erróneas" (artefactos), baja reproducibilidad de los resultados y comigración de bandas. Además, muchos alelos raros presentes en las poblaciones estudiadas con RAPD's no son detectados o pueden ser mal interpretados, y al detectar loci como dominantes, los RAPD's dan menos información genética por locus que los marcadores codominantes, además, la eficiencia de los marcadores RAPD's puede estar influenciada por factores tales como el número de ciclos de amplificación, la cantidad y calidad del ADN inicial, el iniciador utilizado y la temperatura (Rentarúa, 2007, citado en Arteaga, 2017). Por lo que es imprescindible considerar la optimización de todos los parámetros experimentales para asegurar la reproducibilidad de la técnica y los patrones de banda generados.

**La extracción de ADN**, consiste en la separación y purificación de ADN, a partir de material genético de interés, con el fin de obtener una buena cantidad y calidad de ADN, es decir el método debe mantener la integridad física y bioquímica del ADN e incrementar sus rangos de pureza y concentración. (Velasco, 2005) Además, los reactivos empleados en los procesos iniciales de purificación se convierten en agentes contaminantes. Por lo que las metodologías para retirar los contaminantes de una preparación de ADN incluyen: la centrifugación a altas velocidades, la electroforesis, la separación a través de columnas e incluso la utilización de imanes para obtener preparaciones de alta pureza. (Rocha, 2002).

**La diversidad genética** se define como cualquier diferencia que exista en el material hereditario, entre dos o más organismos, ya sea a nivel de componentes fundamentales (adenina, timina, guanina y citosina) que constituyen la cadena de ADN, o bien a nivel de genes, cromosomas, incluso genomas completos. Representa la variación heredable dentro u entre poblaciones de organismos. Se puede estimar mediante la diversidad de genes (proporción de loci polimórficos del total de loci, número de alelos por locus (número de variantes que pueden existir para cada locus) y la heterocigocidad (proporción de individuos estudiados que tienen loci variables) (Domínguez *et al.* 2020). Para su análisis se utilizan herramientas estadísticas para la caracterización del germoplasma y se interpretan mediante análisis de agrupamiento, los valores generados pueden ser interpretados en un grafica en forma de árbol, dendrograma (Nuñez y Escobedo, 2011).

### III. MÉTODO

#### 3.1 TIPO DE INVESTIGACIÓN

- Descriptivo: Se describen los datos obtenidos por protocolo para cada ecotipo.
- Experimental: Se tuvo un rol activo en la investigación, modificando protocolos para descifrar la efectividad de ellas.
- Retrospectivo: Los datos recogidos sobre las muestras ya han sido tomados con anterioridad.
- Transversal: analiza el nivel y la relación entre una o diversas variables en un momento dado.

#### 3.2 ÁMBITO TEMPORAL Y ESPACIAL

En el presente estudio las actividades se desarrollaron dentro del área molecular del Centro de Investigación en Recursos Genéticos, Biotecnología y Bioseguridad (CIRGEBB) ubicado en la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM).

### 3.3 VARIABLES

**Tabla 1**

*Lista de variables utilizados en la tesis*

<b>Variables</b>	<b>Tipo</b>	<b>Clasificación</b>	<b>Valores</b>	<b>Definición conceptual/ Indicador</b>
Patrones de banda	Dependiente	Politómica	Aprox. 6-10	Detección en Gel de agarosa
Perfil Banda	Covariable	Dicotómico	Monomórfico /Polimórfico	Monomórfico si es detectado en todos los individuos. Polimórfico si solo es detectado en genotipos específicos
Puntuación por banda	Covariable	Dicotómico	Presencia (1) / ausencia (0)	Para estimar la frecuencia individual de cada loci.
Tipo de Cebador	Independiente	Politómica	1-10	Para estimación de variabilidad.
Lugar de procedencia	Independiente	Tricotómica	Chota / Cajamarca / San Marcos	Base de datos

Fuente: Elaboración Propia

### 3.4 POBLACIÓN Y MUESTRA

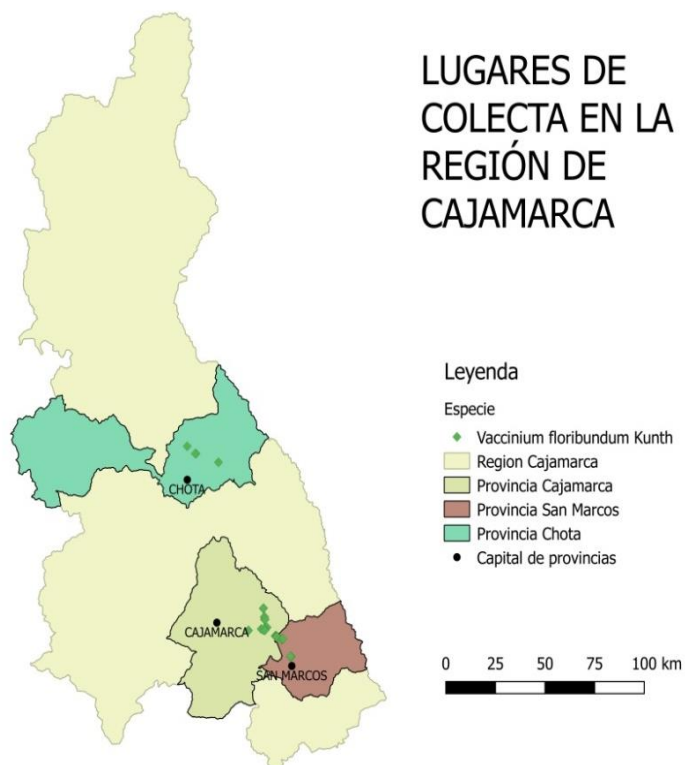
La población del estudio fueron muestras vegetales de 46 ecotipos de *Vaccinium floribundum* Kunth. "Pushgay" correspondientes a 6 poblaciones colectadas en la región Cajamarca, de los distritos de Encañada, Namora, Gregorio Pita, Llacanora, Chalamarca y Conchan.

Las muestras previamente colectadas, conservadas y mantenidas *in vitro* en el cuarto de cultivo del Centro de Investigación en Recursos Genéticos, Biotecnología y Bioseguridad (CIRGEBB), laboratorio ubicado en la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM). La extracción del

ADN se realizó a partir de muestras de hojas frescas, de jóvenes y saludables plántulas de cada ecotipo evaluado.

**Figura 1**

*Lugares de Colecta*



**Nota:** Fuente: Mapa elaborado por el CIRGEBB (Centro de Investigación en Recursos Genéticos, Biotecnología y Bioseguridad de la Universidad Nacional Agraria la Molina).

### 3.5 INSTRUMENTOS

#### 3.5.1 EQUIPOS:

- Microcentrífuga Sigma Laborzentrifugen
- Cabina de Flujo Laminar BBS – DDC BIOBASE
- Balanza de Precisión Portátil AE ADAM Core CQT 202
- Eppendorf BioSpectrometer® básico
- Estufa de convección forzada
- Agitador Para Tubos De Laboratorio Marca Vórtex Mixer

- Campana de Extracción eléctrica.
- BellyDancer® / Baño de agua de hibridación
- Baño María marca MEMMERT
- Congelador Vertical Biobase -20°C.
- Refrigerador Bosch 4°C
- Termociclador de 96 orificios / en Tiempo Real BioRad
- Cámara de Electroforesis Horizontal
- Fuente de alimentación para electroforesis Fisher Biotech FB-105.
- Transiluminador UV 2000 Biorad.

### **3.5.2 SOLUCIONES Y REACTIVOS:**

- Agua ultrapura de grado de Biología molecular
- Taq DNA polimerasa 5U/ul marca HiMedia
- Buffer 10X S (con 1.75mM de Mg Cl<sub>2</sub>) marca Himedia
- Cloruro de Magnesio 50mM marca Himedia
- Desoxinucleótidos trifosfatos (dNTPs) Promega (100uM)
- Primers: OPE-01, OPE-05, OPO-04, OPR-19, OPC-06, OPI-07, BJ-35, BJ-18, BJ-07, BJ-10, BJ-24, BJ-11, UBC-239, UBC-222, UBC-203 sintetizados por Macrogen- Seoul, Korea.
- Marcador de peso molecular HyperLadder marca Bioline-Probioteck
- Marcador de peso molecular Pst I a partir de Lambda DNA marca Thermo Scientific.
- Agarosa marca Himedia
- Solución de TBE 10X marca Thermo Scientific
- Solución tampón de carga de gel 6X marca Himedia
- CTAB 10 X (Cetiltrimetilamonio Bromuro) marca Probiotek
- 2- Mercaptoetanol marca Invitrogen
- Cloroformo Isoamílico marca PanReac AppliChem
- Isopropanol marca PanReac AppliChem
- NaCl marca CDH
- Etanol absoluto marca Merck Millipore

## 3.6 PROCEDIMIENTO

### 3.6.1 EXTRACCIÓN DE ADN

ADN genómico fue extraído de hojas jóvenes utilizando el protocolo de extracción de ADN para *Vaccinium floribundum* Kunth. establecido por el laboratorio del Centro de Investigación en Recursos Genéticos, Biotecnología y Bioseguridad (CIRGEBB) de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM).

Protocolo de extracción de ADN del CIRGEBB (Centro de Investigación en Recursos Genéticos, Biotecnología y Bioseguridad (CIRGEBB))

1. Se pidió las muestras frescas debidamente rotuladas. Se separó las hojas del tallo y el peciolo.
2. Se pesó 75mg de tejido seco licuado en un mortero, se agregó 1.5ml de buffer CTAB 3X (Buffer de lisis).
3. Se agregó 35ul de 2-Mercaptoetanol y dejó la muestra overnight en la Bellydancer a una temperatura de 65<sup>0</sup>C.
4. Al día siguiente, a cada muestra se agregó 80ul de CTAB 10% tibio, se homogenizó en el Vortex.
5. Se agregó Cloroformo isoamílico frío (4<sup>0</sup>C) (1:1 volumen)
6. Se homogenizó en el Vortex y centrifugó a 13500rpm por 15min. Se observó 3 fases: fase líquida (sales y ADN), fase sólida (membrana) y fase cloroformo de color verde (restos).
7. Se procedió a extraer la fase líquida de cada tubo en otro tubo rotulado estéril.
8. Se Agregó 150ul CTAB 10%. Se homogenizó en el Vortex.
9. Se agregó cloroformo isoamílico frío y enrasó a 2ml. Se homogenizó en el Vortex.
10. Se centrifugó a 13500rpm por 15min. [Se observó 3 fases: fase líquida (sales y ADN), fase sólida (membrana) y fase cloroformo de color verde].
11. Se recuperó la fase líquida y se agregó 50ul de NaCl 5M.
12. Se enrasó a 2ml con Isopropanol y pasó a ser homogenizado en Vortex. Se incubó en frío por 3-4horas (como mínimo)

13. Se procedió a concentrar de ADN (Alicuotar 700ul en otro tubo 1.5ml y centrifugar a 13500rpm por 20min)
14. Luego el sobrenadante se decantó. Se realizó esta misma operación hasta que solo quedó el pellet (de color blanquecino).
15. Se agregó 600ul de Etanol absoluto 7:3 de TE 10:1 frio, se agitó y homogenizó hasta llegar a despegar el pellet.
16. Se centrifugó a 13500rpm por 15min y se descartó el sobrenadante, de esta manera solo quedó el pellet.
17. Se dejó secar el alcohol (hasta que el etanol se haya evaporado).
18. Se resuspendió el pellet seco en 100ul de buffer TE 10:1, y se homogenizó en el vórtex.
19. Se almacenó o guardó a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente el ADN obtenido pasó a ser cuantificada.

Las muestras de ADN obtenidos pasaron a ser cuantificado y se descartó si la muestra contenía contaminación.

### 3.6.2 EVALUACIÓN DE CALIDAD Y CONCENTRACIÓN DE ADN

La integridad del ADN obtenido a partir del método de extracción fue evaluada mediante Electroforesis en geles de agarosa al 1%, teñido con Bromuro de Etidio y visualizado en Transiluminador UV 2000 Biorad.

La concentración se determinó con el uso de un bioespectrofotómetro Eppendorf, a una dilución de 4:400ul usando cubetas de cuarzo. Cada muestra fue calculada por sus valores de densidad óptica a 230,260 y 280nm.

Fórmula de cálculo:

$$\text{Concentración } (\mu\text{g} / \text{ml}) = (\text{lectura A } 260 - \text{lectura A } 320) \times \text{factor de dilución} \times F (\mu\text{g} / \text{ml})$$

F: Es 50 ug/ml, para una cubeta de 10mm de largo

La pureza del ADN fue determinado a la razón ADN/proteína (DO260/DO280) para evaluar alguna contaminación con proteínas o RNA, el rango

optimo es de (1.8-2), solo las muestras de ADN de buena calidad fueron usadas en el PCR, las demás fueron descartadas del experimento.

Fórmula de Cálculo:

$$\text{Pureza del ADN } (A_{260} / A_{280}) = (A_{260} \text{ lectura} - A_{320} \text{ lectura}) \div (A_{280} \text{ lectura} - A_{320} \text{ lectura})$$

### 3.6.3 VALIDACIÓN DEL ADN

Para lograr la validación del ADN total extraído, en relación a que es ADN de plantas, se hizo una prueba de PCR con el marcador universal denominado Rbcl (Codifica el gen del cloroplasto). El producto que generó es de aproximadamente 600pb.

### 3.6.4 ESTANDARIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE PCR

Se basa en que se toma en cuenta que la reacción de amplificación se puede optimizar para cada organismo. Para optimizar las condiciones de reacción, y mejorar los resultados de reproducibilidad que se presentan para marcadores RAPDs, fueron testeados parámetros de PCR que incluyen: Concentración de ADN, Concentración del primer, Concentración del Cloruro de Magnesio Concentración de dNTPs, DNA Taq Polimerasa, así como Número de ciclos de denaturación, hibridación y extensión para la amplificación.

En la tabla 2 se muestran los valores de temperatura y tiempo para los ciclos de Denaturación, Hibridación y Extensión de 2 programas de amplificación de PCR, basados en Rodríguez- Sahagún *et al.* 2007, el cual se centra en 2 etapas de ciclos, los cuales se modificaba y reducía 1<sup>o</sup>C la temperatura de hibridación. Este parámetro también se veía modificado al tratar con cada primer.



**Tabla 2***Parámetros de las Condiciones de reacción y amplificación de PCR*

Concentración de ADN (ng)	10	12	20		
Concentración del primer (uM)	0.2	0.4	0.5	0.6	
Concentración del Mg Cl <sub>2</sub> (mM)	1.75	2	2.5	3	4
Concentración de dNTPs (mM)	0.1	0.2	0.5	0.6	0.8
Concentración de DNA taq Polimerasa (U)	1.25	2	2.5	5	
Programas de amplificación	Programa 1		Programa 2		
Temperatura y tiempo	T <sup>0</sup>	Tiempo	T <sup>0</sup>	Tiempo	
Ciclo de Denaturación	94	30''	95	45''	
Ciclo de Hibridación	36	1'	36	1'	
Ciclo de Extensión	72	2'	72	7'	
Numero de ciclos	42		46		

Fuente: Elaboración propia

El procedimiento se efectuó con lo siguiente criterio:

1. Se trabajó en condiciones asépticas, limpiando el área de trabajo en la Cabina de Flujo Laminar BBS – DDC BIOBASE. Se esterilizó el área con luz UV durante 20 minutos.
2. Las muestras de ADN y reactivos se descongelaron en hielo, luego se agitó por inversión y se sometió a un ciclo de spin antes de usar.
3. Se rotularon los tubos de PCR, con los códigos adecuados.
4. Se utilizaron como controles negativos, tubos eppendorf que contenían parte del Master mix sin ADN.
5. En un tubo donde se encuentra el Master mix, se colocaron las cantidades de buffer 10X, añadir Mg Cl<sub>2</sub>, dNTPs, y primers.
6. La Taq polimerasa es la última en ser incorporada al Master mix, en todo momento fue mantenida en frío (hielo).
7. Se homogenizó el cóctel, distribuyó y dispensó las cantidades en cada tubo.

8. Se corrió con el programa establecido para cada primer.

A lo largo de la fase experimental se tomó en consideración lo reportado por Bornet y Branchard (2001), Albert (2003), Rodríguez- Sahagún *et al.* 2007, Albert (2003) y modificaciones del programa de Rodríguez- Sahagún *et al.* 2007.

### 3.6.5 ANÁLISIS DE PRIMERS RAPDS

Luego de estandarizar los componentes del Master mix, se procedió a la estandarización de las condiciones de amplificación para cada primer estudiado (ver Tabla 3), procediendo a evaluar la temperatura de hibridación (annealing) óptima, tomando en cuenta condiciones reportadas en la literatura para el oligonucleótido, así como las temperaturas teóricas según la casa comercial, Macrogen, y la herramienta Oligoanalizadora de la plataforma Tecnologías de ADN integradas (IDT).

**Tabla 3**

*Lista de 15 primers evaluados*

<b>Primer</b>	<b>Secuencia 5'-3'</b>	<b>Temperatura Melting /IDT</b>	<b>GC% (40 -60)</b>
OPE-05	TCAGGGAGG	28.7	66.67
BJ35	CCTCCTCATC	29.4	60
OPR-19	CCTCCTCATC	29.4	60
OPC-06	GAACGGACTC	31.6	60
BJ18	ATGTGCCGTA	32.3	50
BJ10	TAGCGCCAAT	33	50
OPI-07	CAGCGACAAG	33.5	60
BJ24	TGGCGCAATA	33.6	50
BJ11	CACCCGATGA	33.9	60
OPO-04	AAGTCCGCTC	34.6	60
UBC-239	CTGAAGCGGA	34.6	60
OPE-01	CCCAAGGTCC	35.6	70
UBC-222	AAGCCTCCCC	38.3	70
BJ7	ATGCCGCGAT	39.4	60
UBC-203	CACGGCGAGT	40.8	70

Fuente: Los datos de cada primer fueron obtenidos a través de la herramienta Oligoanalizadora de la plataforma Tecnologías de ADN integradas (IDT)

Se analizaron 5 valores de temperaturas por cada cebador y se modificaron las temperaturas de hibridación de acuerdo al programa seleccionado, modificado de Rodríguez- Sahagún *et al.* 2007. Se consideró que la temperatura fue optimizada cuando se obtuvo la información de un patrón de banda de alta resolución.

Luego de hallar la temperatura óptima para cada primer, se escogió un patrón de bandeado de mejor resolución y con el mayor número de bandas. De esta manera se buscó hallar un primer que permita hallar variación alélica entre los ecotipos de *Vaccinium floribundum* Kunth.

Luego de encontrar los marcadores que permitían discriminar los ecotipos, se procedió a correr la totalidad de muestras de ADN de *Vaccinium floribundum* Kunth.

### **3.6.6 ELECTROFORESIS DE AMPLICONES EN GEL DE AGAROSA**

Los productos de amplificación fueron separados por electroforesis en geles de agarosa al 2% durante un lapso de 2 horas y 85 de voltaje, empleando como buffer de corrida una solución de TBE 1X; además se utilizó un marcador de talla para contar con una referencia de los amplicones generados (HyperLadder 100bp), finalmente se realizó la tinción del gel en una solución de Bromuro de Etidio. La visualización fue realizado a través de un Transiluminador UV 2000 Biorad.

## **3.7 ANALISIS DE DATOS**

Los datos cuantitativos obtenidos se registrarán en una base de datos en Excel, gráficos y tablas de contingencia. Asimismo, se registrarán fotografías de los geles obtenidos de las corridas electroforéticas y de los patrones de amplificación.

Los marcadores RAPDs se puntuaron visualizando su presencia (1) o ausencia (0) por separado para cada ecotipo de "Pushgay" y cada cebador. Las bandas no identificadas por los dos lectores se consideraron como no puntuables. Las puntuaciones obtenidas utilizando todos los cebadores en el análisis RAPD se

agruparon para construir una matriz de datos única. Se asumió que la banda es monomórfica si se detectaba en todos los individuos explorados. Como perfil polimórfico se consideran bandas detectadas en genotipos específicos, bandas no presentes en todos los individuos analizados.

Las diferentes combinaciones de bandas obtenidas para cada cebador se calificarán como patrones de bandas.

La matriz de datos se usó para estimar el porcentaje de los loci polimórficos, el coeficiente de diversidad de genes de Nei (1973), el índice de información de Shannon, el parámetro GST o coeficiente de diferenciación genética entre especies y entre poblaciones, el flujo de genes (Nm) o número de migrantes efectivos, la distancia de genes (D) y la construcción de un dendrograma UPGMA (Grupo de pares no ponderados de media aritmética) entre poblaciones utilizando el programa informático POPGENE (versión 1.32) (Yeh *et al.*, 1999).

La matriz de datos también permitió calcular el medidas de similitud y distancia genética entre los pares de todos los grupos de ecotipos, analizados utilizando la fórmula Dice (Nei, 1972).

Para el análisis clúster (de conglomerado) se empleó el paquete software PAST (Hammer *et al.* 2001). Utilizando la matriz de similaridad genética obtenida a través del programa informático POPGENE (versión 1.32).

### **3.8 CONSIDERACIONES ÉTICAS**

Los ecotipos colectados por el proyecto “Domesticación de Berries Nativos de la región Cajamarca, relacionados al arándano, mediante el uso de las herramientas biotecnológicas” a partir del cual, ésta investigación pudo comenzar las extracciones de ADN de los 46 individuos de *Vaccinium floribundum* Kunth., fueron autorizadas por el Servicio Nacional Forestal y de Fauna Silvestre (SERFOR) a la investigadora Dra. Antonietta Ornella Gutiérrez Rosati mediante el Número de autorización: N<sup>o</sup> AUT-IFL-2019-009, correspondiente al “Estudio de la Variabilidad de Berries Nativos de la región Cajamarca a través de su Identificación Taxonómica”, en la que el área estudiada indicaba coordenadas geográficas para todas las zonas de colecta.

#### IV. RESULTADOS

Haciendo uso del protocolo de extracción de ADN establecido por el CIRGEBB se obtuvieron extracciones para la totalidad de los 46 ecotipos de *Vaccinium floribundum* "Pushgay", ecotipos colectados en diferentes localidades (Ver tabla 4). Debido a que no siempre se contó con la misma cantidad en peso (mg de las hojas jóvenes de la plántula), no se obtuvieron altas concentraciones de ADN, pero lo obtenido fue más que suficiente para poder realizar la investigación. Los valores de pureza (260/280) para las muestras presentes en la tabla, revelan que se encuentran dentro en un rango de 1.68 y 2.28, una pureza optima aceptable.

De los 15 marcadores RAPDs estudiados (Ver tabla 3), se logró optimizar las concentraciones de los componentes del Master mix para 3 de ellos (OPE-01, BJ-18 y OPO-04), para los cuales se obtuvieron patrones de bandeo con buena resolución y de forma reproducible.

**Tabla 4***Concentración y Pureza de ADN de V. floribundum Kunth*

Muestra	Código ID	Nombre científico	Peso (mg)	Concentración ug /ml	Pureza A260/A280
1	CAJA,Namo-01	<i>Vaccinium floribundum Kunth.</i>	21.2	301.1	1.84
2	CAJA,Namo-02	<i>Vaccinium floribundum Kunth.</i>	28.7	370.9	1.92
3	CAJA, Llac -01	<i>Vaccinium floribundum Kunth.</i>	24.7	199.8	1.86
4	CAJA,Namo-07	<i>Vaccinium floribundum Kunth.</i>	16.4	272.0	1.90
5	CAJA,Namo-09	<i>Vaccinium floribundum Kunth.</i>	17.9	233.1	1.91
6	CAJA,Namo-10	<i>Vaccinium floribundum Kunth.</i>	21.6	331.1	1.96
7	CAJA,Namo-12	<i>Vaccinium floribundum Kunth.</i>	17.4	291.2	1.97
8	CAJA,Namo-13	<i>Vaccinium floribundum Kunth.</i>	20.0	266.5	1.94
9	CAJA, Enca 01	<i>Vaccinium floribundum Kunth.</i>	25.2	207.7	1.91
10	CAJA, Enca 02	<i>Vaccinium floribundum Kunth.</i>	6.8	102.0	2.08
11	CAJA, Enca 03	<i>Vaccinium floribundum Kunth.</i>	26	313.0	1.93
12	CAJA, Enca 04	<i>Vaccinium floribundum Kunth.</i>	14.4	285.4	1.92
13	CAJA, Enca 05	<i>Vaccinium floribundum Kunth.</i>	9.4	174.1	2.03
14	CAJA, Enca 08	<i>Vaccinium floribundum Kunth.</i>	7.4	175.4	2.00
15	CAJA, Enca 10	<i>Vaccinium floribundum Kunth.</i>	25.4	268.4	1.89
16	CHOT, Chal 02	<i>Vaccinium floribundum Kunth.</i>	13.1	234.8	2.03
17	SMAR, Gpit 01	<i>Vaccinium floribundum Kunth.</i>	25.3	178.6	2.28
18	SMAR, Gpit 03	<i>Vaccinium floribundum Kunth.</i>	29.8	333.8	1.93
19	SMAR, Gpit 04	<i>Vaccinium floribundum Kunth.</i>	18.2	156.2	1.79
20	SMAR, Gpit 05	<i>Vaccinium floribundum Kunth.</i>	24.9	366.1	1.96
21	SMAR, Gpit 10	<i>Vaccinium floribundum Kunth.</i>	40.4	215.6	2.03
22	SMAR, Gpit 11	<i>Vaccinium floribundum Kunth.</i>	23.6	357.9	1.68
23	SMAR, Gpit 12	<i>Vaccinium floribundum Kunth.</i>	25.2	322.3	1.99
24	SMAR, Gpit 13	<i>Vaccinium floribundum Kunth.</i>	9.7	207.4	1.79
25	CAJA,Namo-16	<i>Vaccinium floribundum Kunth.</i>	23	212.3	1.93
26	CAJA,Namo-17	<i>Vaccinium floribundum Kunth.</i>	66	142.8	1.83
27	CHOT, Conch 03	<i>Vaccinium floribundum Kunth.</i>	25.8	197.4	1.93
28	CAJA,Namo-18	<i>Vaccinium floribundum Kunth.</i>	14.9	147.1	2.17
29	CAJA,Namo-20	<i>Vaccinium floribundum Kunth.</i>	8.9	202.5	1.71
30	CAJA,Namo-21	<i>Vaccinium floribundum Kunth.</i>	5.4	149.7	1.82
31	CAJA,Namo-22	<i>Vaccinium floribundum Kunth.</i>	89.6	351.0	1.99
32	CAJA,Namo-23	<i>Vaccinium floribundum Kunth.</i>	18.5	148.4	2.28
33	CAJA,Namo-24	<i>Vaccinium floribundum Kunth.</i>	20	150.1	2.21
34	CAJA, Enca 14	<i>Vaccinium floribundum Kunth.</i>	47.4	204.1	1.75
35	CAJA, Enca 15	<i>Vaccinium floribundum Kunth.</i>	10.8	108.1	2.04
36	CAJA, Enca 17	<i>Vaccinium floribundum Kunth.</i>	28.7	235.3	1.81
37	CAJA, Enca 19	<i>Vaccinium floribundum Kunth.</i>	23.1	209.1	1.92
38	CAJA, Enca 20	<i>Vaccinium floribundum Kunth.</i>	18	183.5	2.14
39	CAJA, Enca 21	<i>Vaccinium floribundum Kunth.</i>	17.4	174.3	2.23
40	CAJA, Enca 22	<i>Vaccinium floribundum Kunth.</i>	21.4	239.6	1.93
41	CAJA, Enca 23	<i>Vaccinium floribundum Kunth.</i>	17.2	214.3	1.96
42	SMAR, Gpit 14	<i>Vaccinium floribundum Kunth.</i>	28	329.5	2.01
43	SMAR, Gpit 15	<i>Vaccinium floribundum Kunth.</i>	13.8	200.0	2.28
44	SMAR, Gpit 16	<i>Vaccinium floribundum Kunth.</i>	16.7	213.9	2.16
45	SMAR, Gpit 17	<i>Vaccinium floribundum Kunth.</i>	46	238.2	1.96
46	CHOT, Conch 14	<i>Vaccinium floribundum Kunth.</i>	30	256.3	2.00

Fuente: Elaboración propia

Como resultado de la estandarización del Master mix, se halló las cantidades y concentraciones finales necesarias para una amplificación exitosa del ADN del *Vaccinium floribundum* Kunth "Pushgay" (Tabla 4).

**Tabla 5**

*Valores de concentraciones de reactivos para PCR*

<b>Master mix para el PCR</b>	<b>[Inicial]</b>	<b>[Final]</b>	<b>1X (ul)</b>
H2O de grado Molecular	-	-	18.15
Buffer 10X S Himedia (17.5mM MgCl <sub>2</sub> )	10X	1X	2.5
MgCl <sub>2</sub> (mM) Himedia	50mM	0	0
dNTPs (mM)	10mM	0.6mM	1.5
Primer (uM)	10uM	0.5mM	1.25
Taq polimerasa Himedia (U)	5U/ul	0.08U/ul	0.4
ADN (ng/ul)	10ng/ul	0.48ng/ul	1.2
Volumen Total			25ul

Fuente: Elaboración propia

Para la adecuada amplificación del ADN, se estableció un programa de ciclos del PCR, los valores se muestran en la Tabla 6. El programa seleccionado fue el Programa 2 (ver Tabla 2). Este programa fue modificado a partir de Rodríguez-Sahagún *et al.* 2007, el cual se centra en 2 etapas de ciclos, los cuales se modificaba y reducía en 1°C la temperatura de annealing.

**Tabla 6***Parámetros de condiciones de PCR estandarizado*

<b>Etapa</b>	<b>T(°C)</b>	<b>Tiempo</b>	<b>Ciclos</b>
Pre-denaturación	95	5´	1 ciclo
Denaturación	95	45´´	
Annealing	36	1´	4 ciclos
Extensión	74	2´	
Denaturación	95	45´´	
Annealing	35	1´	40 ciclos
Extensión	74	2´	
Extensión-Final	74	7´	1 ciclo
T° mantenimiento	4	∞	-

Fuente: Elaboración Propia

La temperatura de annealing variaba dependiendo del marcador que se estaba amplificando. De esta forma se halló una temperatura óptima diferente para cada primer, aunque no se logró determinar para el total de los marcadores evaluados (caso de BJ-10 y BJ-7), los valores se muestran en la Tabla 7 adjunta.

Generalmente se proyecta obtener una definición de perfil de bandas a una temperatura ideal en el cual los cebadores se hibriden y unan a la plantilla de ADN. Se pudo observar que esta regla no se cumple para todos los marcadores estudiados, mientras que para el marcador BJ-18 se pudo observar cómo afecta la temperatura de hibridación en la aparición o pérdida de bandas, en el caso del marcador OPR-19, no se observó cambios significativos en su perfil de banda al variar la temperatura.

Los productos de la amplificación de PCR para el marcador OPE-05 presentó poca definición, bandas no definidas, luego de haber sido testeadas las temperaturas de hibridación y con una cantidad considerable de Taq polimerasa. Para el caso del marcador OPE-05, se encontró una banda de bajo peso (aprox. 700bp), no mencionada por otros investigadores.



Para los marcadores BJ-35 y OPR-19, se observó que al incrementar la concentración de magnesio a 2mM y la cantidad de ADN a 20ng, no hubo incremento de número de bandas en el perfil de bandeo, al contrario, el patrón de bandas permaneció igual. Estos marcadores, así como OPC-06, dieron el menor número de bandas, por lo que no fue utilizado para correr el total de muestras.

No se utilizaron los marcadores BJ-24, BJ-11 y UBC-203 en el análisis de todos los ecotipo, debido a que no presentaba una buena resolución de patrones de bandeo, esto a pesar que tenía como característica variación alélica entre los individuos de prueba analizados.

Los patrones de bandeo de los marcadores UBC-239 y UBC-222 no presentaban resolución, mientras que el primero mostraba presencia de bandas con smear, el segundo presentaba un patrón de bandeo difuminado, por lo que no se pudo realizar el test de variación alélica. A pesar del resultado obtenido para el marcador UBC-239, se observó que el patrón de bandas se repetía para 3 ecotipos de *Vaccinium floribundum* Kunth., por lo que se debería verificar si este marcador podría discriminar entre la especie antes mencionada de otras especies similares.

Los resultados para los marcadores BJ-10, BJ-07 y OPI-07 no fueron los esperados, dado que, en el caso del primero, no se obtuvo segmentos de ADN amplificados, y para los 2 últimos solo se pudo notar la amplificación de solo 1 banda, siendo estos referenciados por otros investigadores con buenos productos de PCR. Se debe optimizar un Master mix para cada uno de ellos, dado que no se definió la temperatura de annealing luego de test de temperaturas, estos merecen ser debidamente estandarizados con otro Master mix y probar otro programa de ciclos de PCR.

De los 15 primers RAPD evaluados en este estudio, solo 3 primers (BJ-18, OPO-04, OPE-01) detectaron un total de 33 amplicones en 46 ecotipos de *Vaccinium floribundum* Kunth.

**Tabla 7***Valores obtenidos para los 15 primers RAPDs*

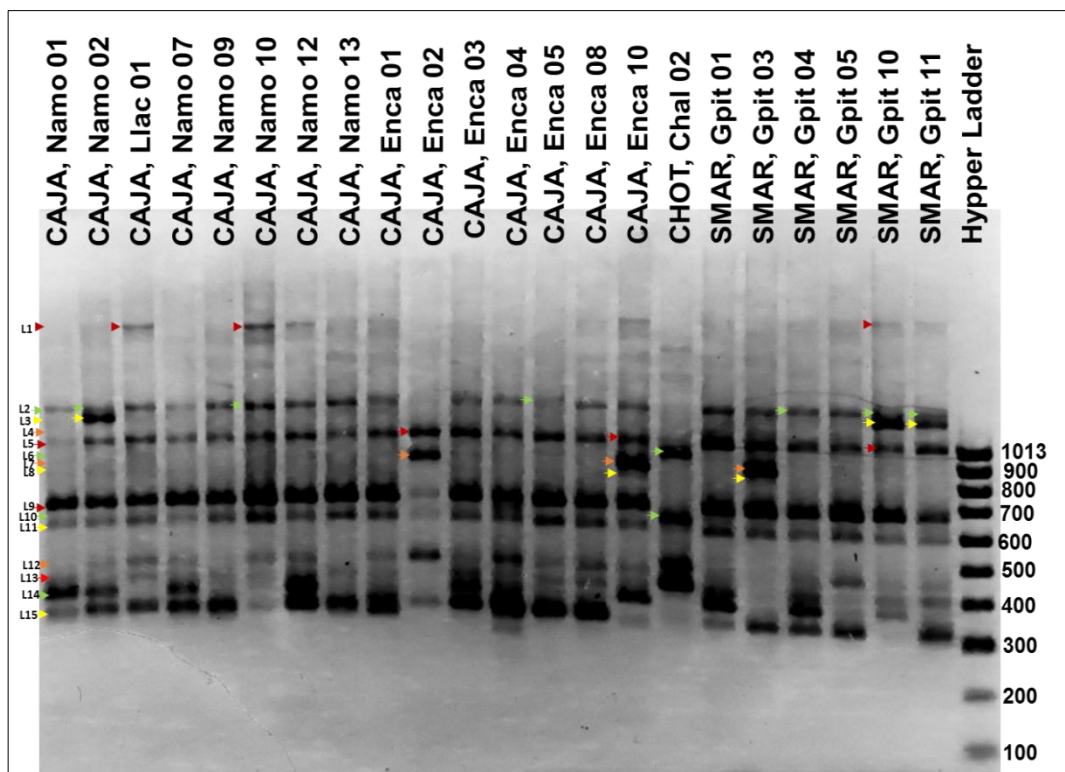
<b>Primers Analizados</b>	<b>Secuencia 5'-3'</b>	<b>Temperatura Melting /IDT</b>	<b>% GC (40-60)</b>	<b>Temperatura optima hallada (°C)</b>	<b># de bandas</b>	<b>Tamaño bandas (bp)</b>	<b>Presenta variación alélica</b>
OPE-05	TCAGGGAGG	28.7	66.67	35-34	8	600-2000	No determinado
BJ35	CCTCCTCATC	29.4	60	37-36	4	700-2000	No
OPR-19	CCTCCTCATC	29.4	60	35-34	4	1000-2000	Si
OPC-06	GAACGGACTC	31.6	60	37-36	5	600-1900	Si
BJ18*	ATGTGCCGTA	32.3	50	39-38	14	400-2450	Si
BJ10	TAGCGCCAAT	33	50	No amplifico	-	-	-
OPI-07	CAGCGACAAG	33.5	60	No definido	1	1500	No
BJ24	TGGCGCAATA	33.6	50	37-36	9	600-1500	Si
BJ11	CACCCGATGA	33.9	60	36-35	8	400-2000	Si
OPO-04*	AAGTCCGCTC	34.6	60	39-38	9	250-1200	Si
UBC-239	CTGAAGCGGA	34.6	60	45-44	8	400-1200	No
OPE-01*	CCCAAGGTCC	35.6	70	45-44	10	480-1500	Si
UBC-222	AAGCCTCCCC	38.3	70	45-44	8	450-1300	No determinado
BJ7	ATGCCGCGAT	39.4	60	No definida	1	-	No determinado
UBC-203	CACGGCGAGT	40.8	70	45-44	6	700-1600	No

Fuente: Elaboración propia

Nota: \*Primers seleccionados para el análisis de las muestras de ADN

**Figura 2**

*Perfiles de amplificación del marcador RAPD BJ-18 de 22 ecotipos*



Fuente: Elaboración Propia

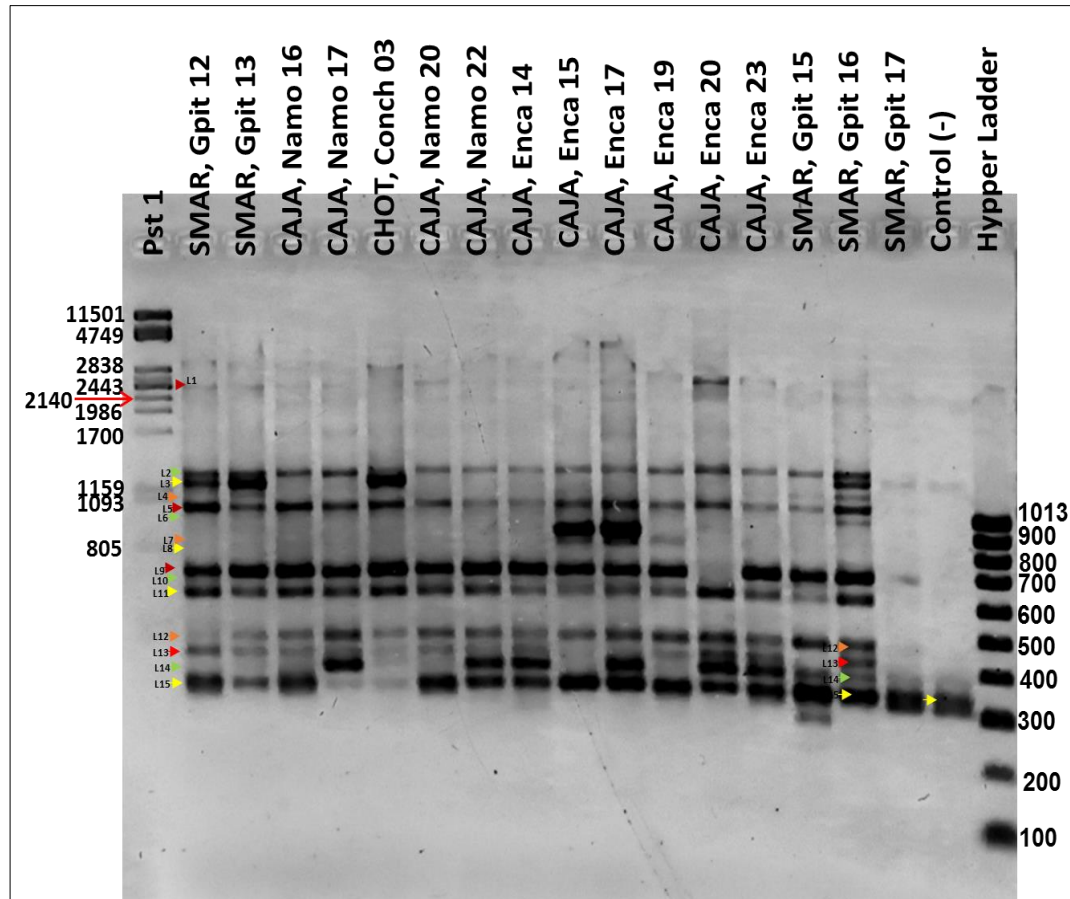
**Nota:** Se observan distintos patrones de banda de generados por la amplificación del marcador Bj18 en 22 ecotipos de *Vaccinium floribundum* Kunth.

Se observa en la figura 2 los perfiles de banda, para la un total de 22 muestras de *Vaccinium floribundum* Kunth. usando el marcador RAPD BJ-18. Las bandas con muy buena resolución que permiten hacer el reconocimiento y lecturas de bandas.

Se introdujo en el último carril un marcador de peso Molecular Hyper ladder, el cual nos permitió conocer el peso molecular de las bandas de bajo peso, se observa que las bandas son mayores a 300pb.

**Figura 3**

*Los patrones de bandas generados por BJ-18 para 16 ecotipos*



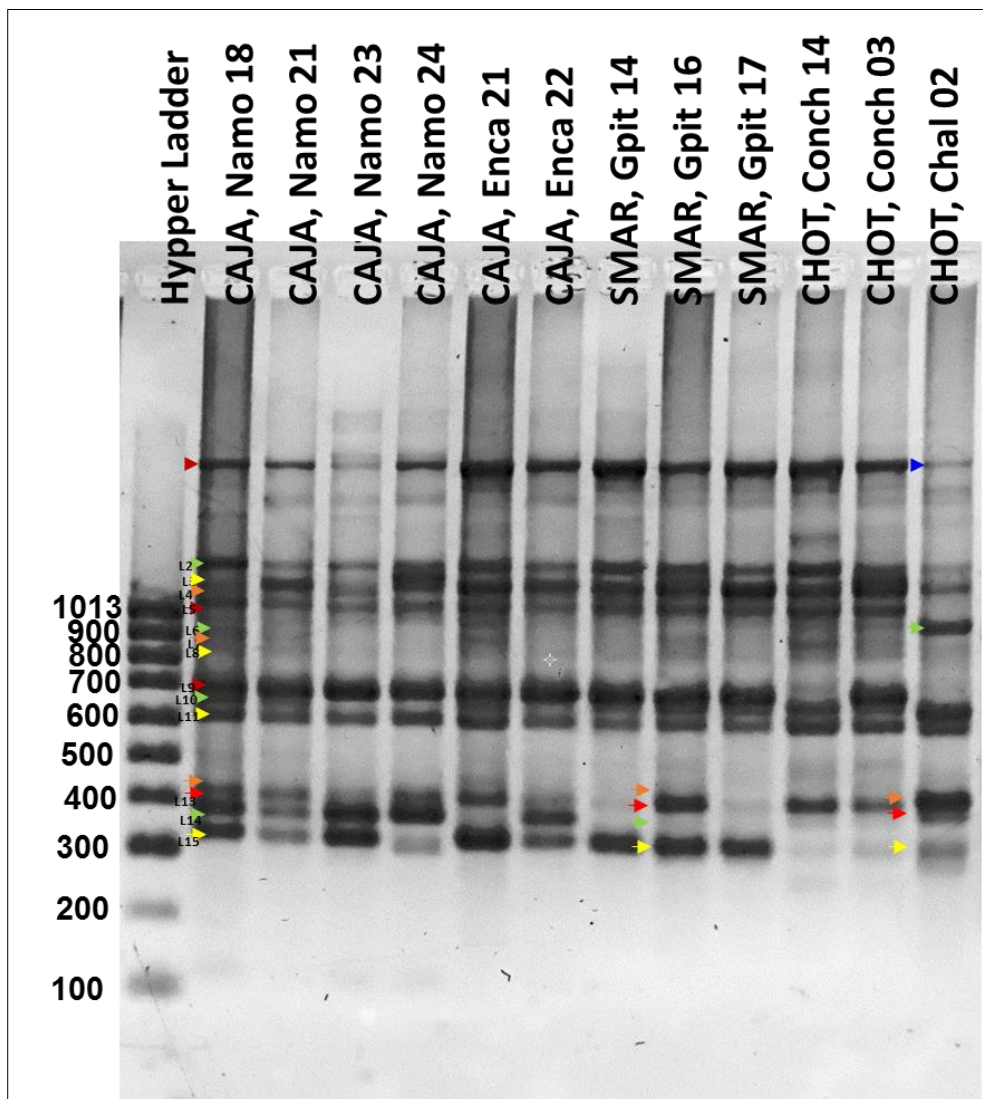
Fuente: Elaboración propia.

Se observa los perfiles de bandas de 16 ecotipos de *Vaccinium floribundum* Kunth. y la adición de un carril con un control negativo. En dicho carril se observa una banda de bajo peso molecular por que fue necesario no contabilizar último alelo.

En la figura 3, se observa un carril adicional de un marcador de peso molecular llamado Pst I, el primer carril de la plantilla de ADN, este marcador permite aproximarnos al valor del tamaño de bandas de mayor peso molecular de los perfiles de bandas generados por el primer B<sub>j</sub>-18.

**Figura 4**

Patrones de bandas generados por el marcador BJ-18 para 12 ecotipos de *Vaccinium floribundum* Kunth.



Fuente: Elaboración propia.

Se observa 3 figuras (2,3 y 4) que muestran los perfiles de banda que en suma, corresponden al total de muestras de *Vaccinium floribundum* Kunth. (46 genotipos) usando el marcador RAPD BJ-18.

En la figura 4, se observa que 3 muestras (SMAR-Gpit 16, CHOT-Conch 03 y CHOT-Chal 02) mostraron reproducibilidad de la prueba.

El patrón de bandas del ecotipo SMAR-Gpit 16 en la figuras 3 y 4, no se vuelve a repetir el perfil de banda en la segunda amplificación. En la primera amplificación (figura 3) realizada se mostraron 4 alelos de bajo peso, en la segunda amplificación (figura 4) se mostraron solo 2 alelo, todas ellas de bajo peso molecular. Se observó en el los perfiles de bandas del ecotipo CHOT-Conch 03 en la figuras 2 y 4, la incorporación de un primer alelo (aprox. 2450bp) y también se observó en el los perfiles de bandas del ecotipo CHOT-Chal 02 (Figuras 2 y 4) la pérdida de 3 alelos de moderado y bajo peso molecular (aprox. 1159, 500 y 400bp).

Estos resultados indican, la baja reproducibilidad que presenta este marcador RAPDs, demostrando así su poca confiabilidad.

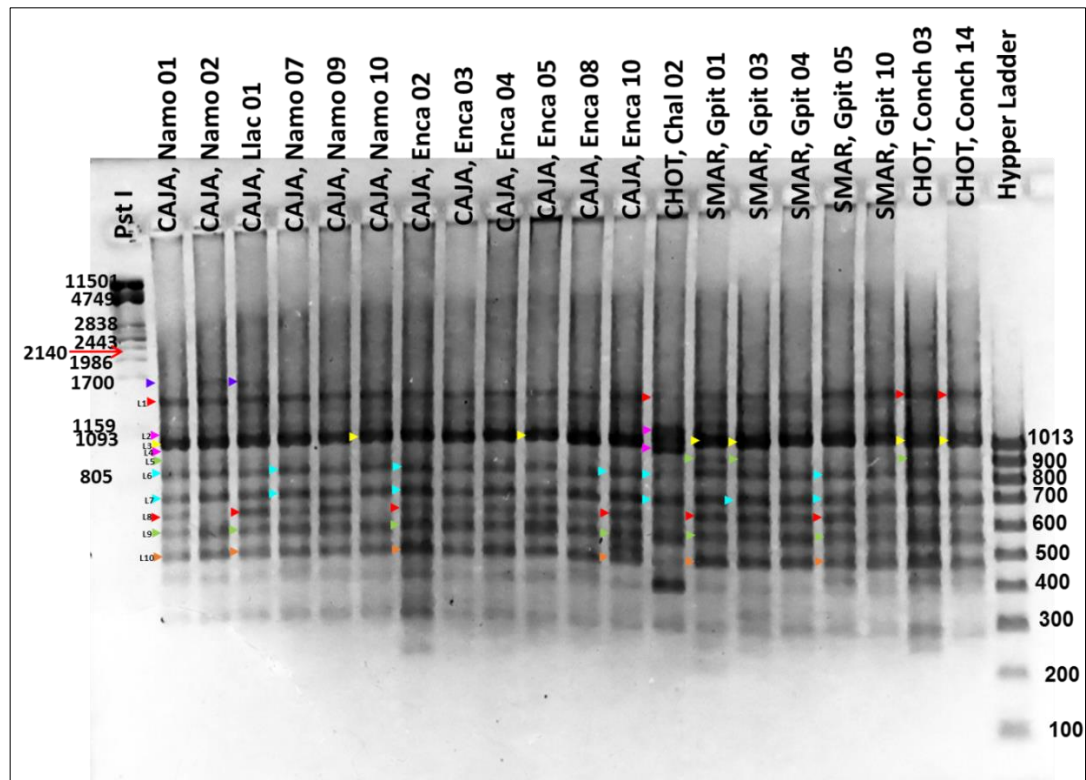
En la figura 4 se observa la repetición de la corrida electroforética de la muestra correspondiente al ecotipo SMAR, Gpit 17, esto se debió a que la muestra no se cargó adecuadamente en el gel (figura 3) por lo que se observa un perfil difuminado, para corregir se volvió a repetir la corrida electroforética y se observó un perfil con buena resolución (figura 4).

Por otro lado, en la misma figura 4, se muestra la banda correspondiente al primer alelo para el ecotipo CHOT-CHAL 02, banda que podría no tomarse en cuenta al momento de hacer la lectura (figura 2), debido a que la imagen es poco clara. Este resultado define al primer alelo como monomórfico (flecha de color azul).

En las figuras 5, 6 y 7 se visualizan los perfiles de banda para el total de muestras de *Vaccinium floribundum* Kunth. generados por el marcador OPE-01. Inicialmente se corrieron los productos amplificados del PCR-RAPD, los cuales produjeron perfiles de bandas intensas (Figura 5), posteriormente se disminuyó la cantidad de muestra (5ul) colocado al buffer de carga. El patrón de bandas obtenido con una mejor resolución tiene un peso molecular con un rango de 480-1500 bp (ver figura 6).

### Figura 5

Patrones de bandas generados por el marcador OPE-01 para 20 ecotipos de *Vaccinium floribundum* Kunth.



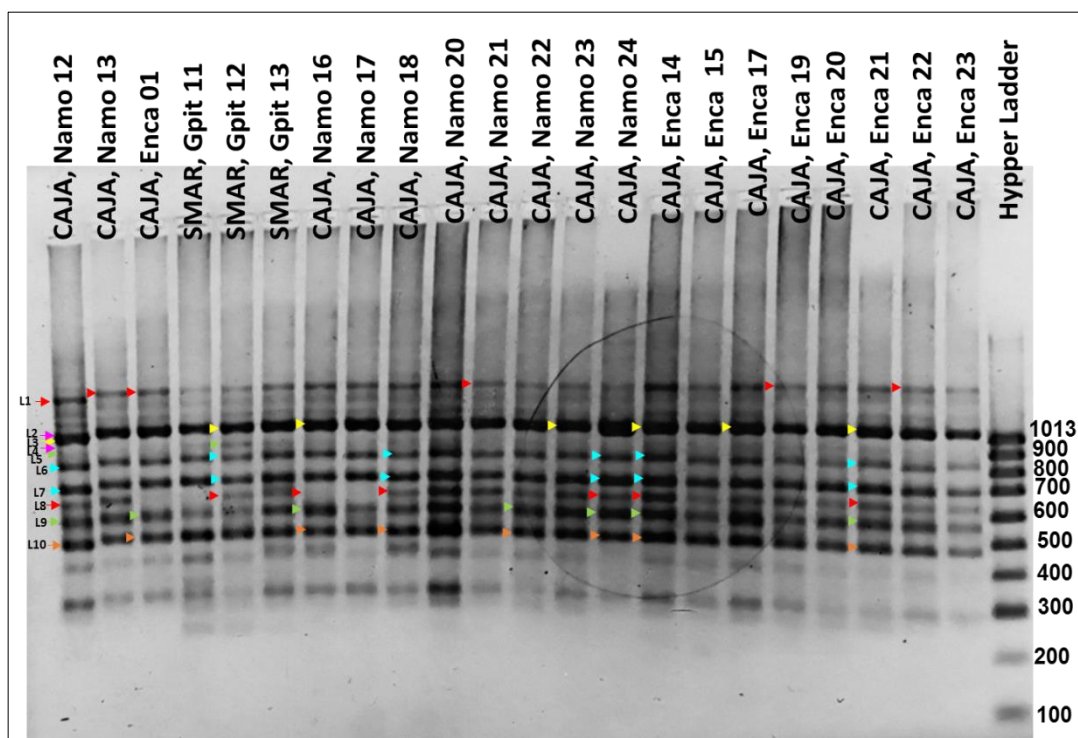
Fuente: Elaboración Propia

**Nota:** Se observa patrones de bandas muy intensas.

Con el análisis de las figuras 5 y 6, podemos decir que los perfiles de bandas generados por el marcador OPE-01 tiene un rango de peso molecular de aproximadamente entre 480 – 1500pb. Además se nota una lectura de 10 alelos, esta información se debe corroborar con el análisis de control negativo presente en la figura 7.

**Figura 6**

Patrones de bandas generados por el marcador OPE-01 para 22 ecotipos de *Vaccinium floribundum* Kunth.



Fuente: Elaboración propia.

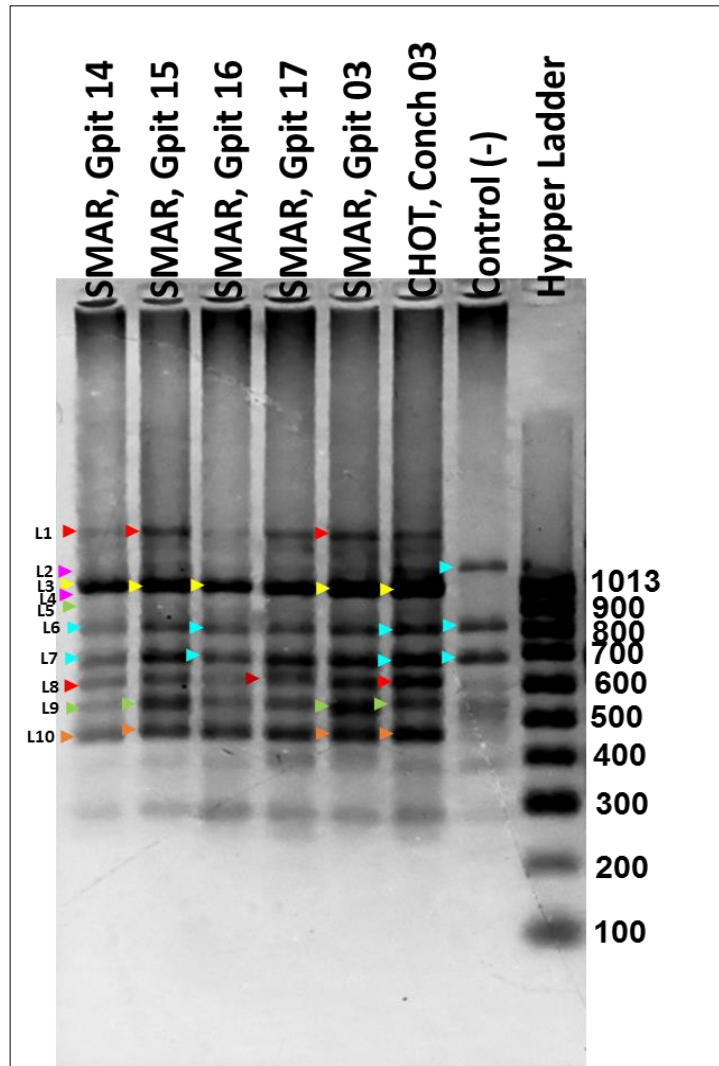
**Nota:** Se observa perfiles de bandas generados por OPE-01, con mejor resolución y contraste.

Los alelos correspondientes a L6 y L7 (flechas de color celeste, de apróx. 700 y 800pb) no fueron tomados en cuenta para el Genotipado dado que éstas aparecieron también en el control negativo. En consecuencia, de un total de 10 bandas amplificadas por el marcador OPE-01, solamente se utilizó 8 de ellas fueron incorporados en la matriz binaria, para el procedimiento de genotipado.



**Figura 7**

*Perfil de bandas RAPD, generados usando el marcador OPE-01 para 6 ecotipos de Vaccinium floribundum Kunth.*



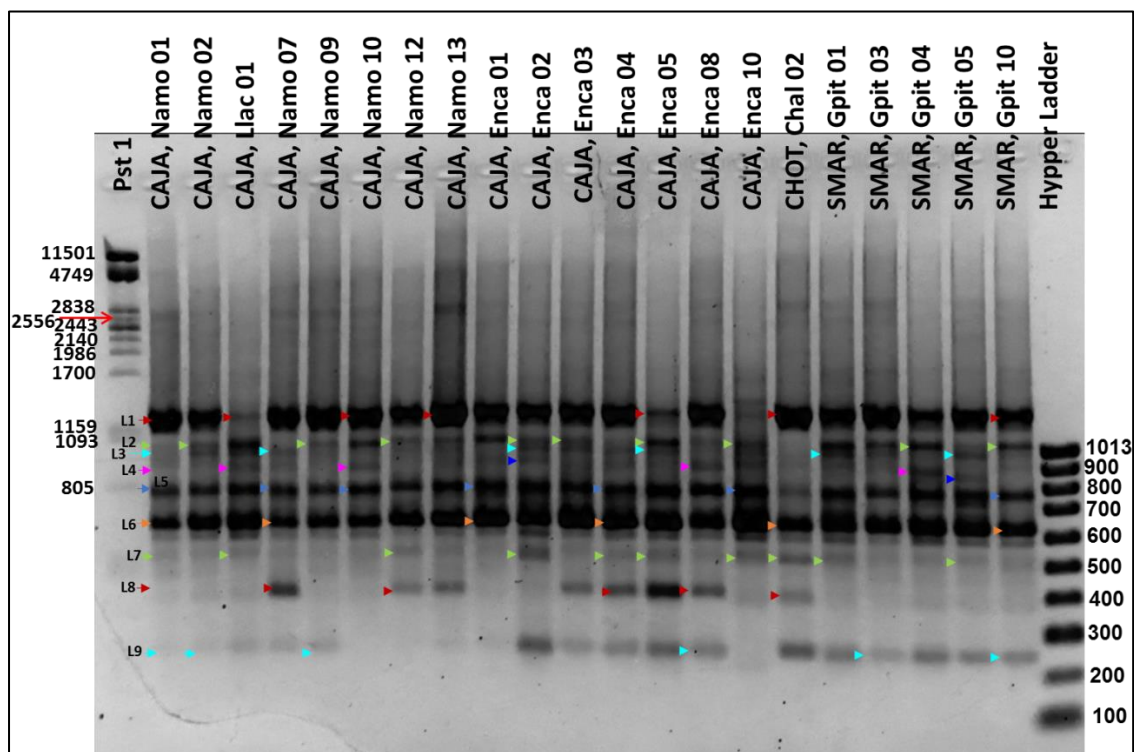
Fuente: Elaboración Propia.

**Nota:** De la figura se resaltan las 3 bandas en el control negativo.

Al evaluar la reproducibilidad de éste marcador RAPD, las muestras de los ecotipos SMAR-Gpit 03 y CHOT-Conch 03 sólo difirieron en 1 sola banda (alelo L5 aprox. 900bp) los carriles para ambas muestras se pueden identificar en las figuras 5 y 7.

**Figura 8**

*Perfiles de amplificación del marcador RAPD OPO-04 para 21 ecotipos de Vaccinium floribundum Kunth.*



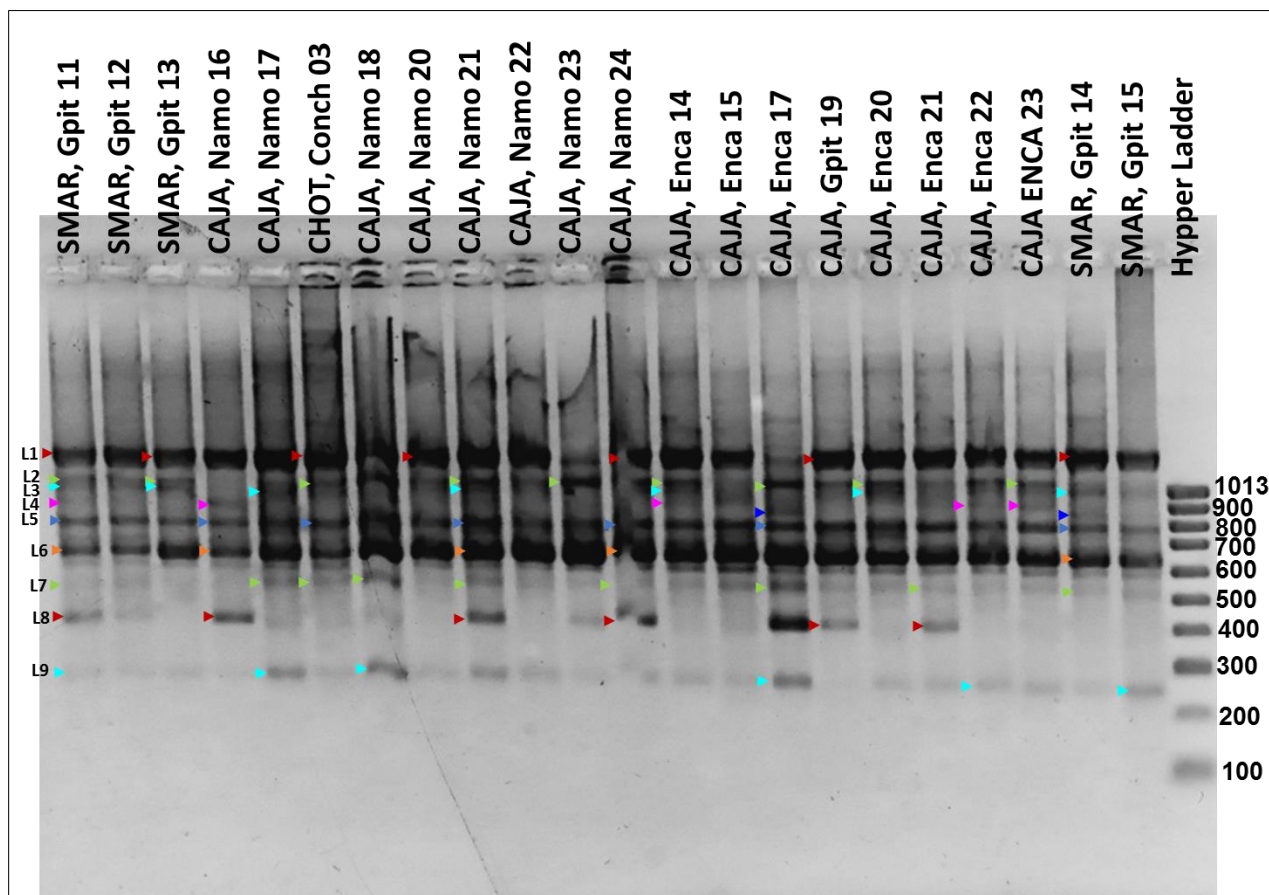
Fuente: Elaboración Propia.

**Nota:** se observa el perfil de bandas generadas por el primer OPO-04, presenta un rango bajo de peso molecular. El primer alelo (banda de mayor tamaño) se encuentra pesando un poco más de 1159pb.

EL marcador amplificó un total de 9 bandas, que se encuentran en un rango de peso molecular que va desde los 250-1200 bp. Los Alelos L3, L5 y L9, no fueron tomados en cuenta al momento de realizar el Genotipado, dado que el control negativo presentaba bandas del mismo peso molecular (Figura 10), y con la finalidad de evitar un sesgo en los análisis de datos, estos fueron removidos y no incluidos en la matriz binaria. En consecuencia, de un total de 9 bandas amplificadas por el marcador OPO-04, solamente se utilizó 6 de ellas para el procedimiento de genotipado.

Figura 9

Corrida electroforética no homogénea



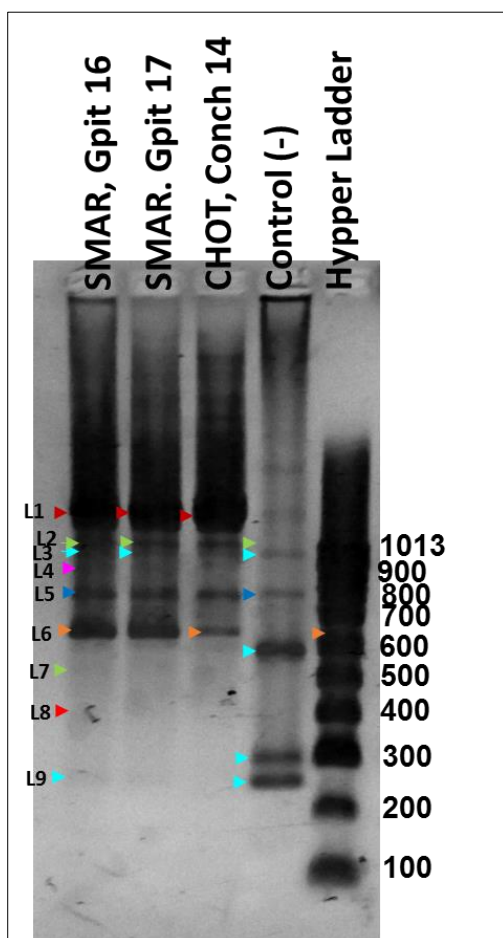
Fuente: Elaboración propia.

**Nota:** Perfil de bandas generadas por un error en la Electroforesis

En la Figura 9, se observa un perfil RAPD de 22 ecotipos de *Vaccinium floribundum* Kunth. generado usando el marcador OPO-04 con una corrida electroforética no homogénea producto de una deformidad en los pocillos del gel de agarosa, por lo tanto, las muestras implicadas se volvieron a correr, la lectura de los productos de amplificación presentaron el mismo patrón de bandas similar al lo establecido en la figura 9.

**Figura 10**

*Perfil RAPD obtenido utilizando el marcador OPO-04, para 3 ecotipos de Vaccinium floribundum Kunth.*



Fuente: Elaboración propia.

**Nota:** Perfiles RAPD presentan problemas con los controles Negativos.

En la figura 9 se observa un carril con la presencia de un control negativo, se pudieron identificar las bandas que tenían el mismo peso molecular en los patrones de los genotipos evaluados. De los 9 alelos identificados inicialmente 3 de ellas no se consideraron para el ingreso en la matriz binaria. Solo 6 alelos fueron ingresados para los análisis de diversidad genética.

Se genotiparon los alelos generados por los 3 primers (BJ-18, OPE-01 y OPO-04) que fueron encontrados óptimos para caracterizar molecularmente a las 46 accesiones de *Vaccinium floribundum* Kunth. utilizando las condiciones y mezcla de reacción de PCR señalados previamente. Estas accesiones están compuestas por 15 accesiones del distrito de Namora, 15 accesiones del distrito de Encañada y una accesión del distrito de Llacanora todos ellos de la provincia de Cajamarca, 12 accesiones del distrito de Gregorio Pita en la provincia de San Marcos, una accesión del distrito de Chalamarca y 2 accesiones del distrito de Conchan en la Provincia de Chota.

Las puntuaciones del perfil de bandas generadas fueron ingresadas en una matriz binaria, como presencia (1) o ausencia (0) de bandas. Cada marcador origina una matriz para el total de las poblaciones y junto con el número de locis generados. Se requirió la información de Número de poblaciones, número de loci y nombre de locus. Estos datos fueron colocados en un formato determinado, tal como se presenta en las tablas 8, 9 y 10. Cada una de estas localidades (distritos) fueron designadas como poblaciones y colocadas en la matriz con las siguientes designaciones: ID 1= Namora, ID 2=Encañada, ID 3= Llacanora, ID 4=Chalamarca, ID 5= Gregorio Pita e ID 6= Conchan.

**Tabla 8***Matriz binaria para las bandas generadas con el marcador BJ-18.*

/*RAPD BJ18*/														
Numero de Poblaciones = 6														
Numero de locis = 14														
Nombre de locus:														
Muestras	L1	L2	L3	L4	L5	L6	L7	L8	L9	L10	L11	L12	L13	L14
	ID =	1												
CAJA,Namo-01	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1
CAJA,Namo-02	0	1	1	0	1	0	0	0	1	0	1	1	0	1
CAJA,Namo-07	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1
CAJA,Namo-09	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0
CAJA,Namo-10	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	1	0	0
CAJA,Namo-12	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1
CAJA,Namo-13	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0
CAJA,Namo-16	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	1	1	0
CAJA,Namo-17	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1
CAJA,Namo-18	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1
CAJA,Namo-20	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	1	1	0
CAJA,Namo-21	1	1	0	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	1
CAJA,Namo-22	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1
CAJA,Namo-23	1	1	0	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	1
CAJA,Namo-24	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	1
	ID =	2												
CAJA, Enca 01	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1
CAJA, Enca 02	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	1	0	0
CAJA, Enca 03	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	1
CAJA, Enca 04	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1
CAJA, Enca 05	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	1	1	0
CAJA, Enca 08	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	1	1	0
CAJA, Enca 10	1	1	0	0	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1
CAJA, Enca 14	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1
CAJA, Enca 15	0	1	0	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0
CAJA, Enca 17	1	1	0	0	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1
CAJA, Enca 19	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	0
CAJA, Enca 20	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1
CAJA, Enca 21	1	1	0	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	0
CAJA, Enca 22	1	1	0	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	1
CAJA, Enca 23	1	1	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1
	ID =	3												
CAJA, Llac -01	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	1	1	0
	ID =	4												
CHOT, Chal 02	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	1	0
	ID =	5												
SMAR, Gpit 01	0	1	0	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	1
SMAR, Gpit 03	0	1	0	1	1	0	1	1	1	0	1	0	0	0
SMAR, Gpit 04	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	1
SMAR, Gpit 05	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	1	0	0
SMAR, Gpit 10	1	1	1	0	1	0	0	0	1	0	1	1	0	0
SMAR, Gpit 11	1	1	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	1
SMAR, Gpit 12	1	1	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0
SMAR, Gpit 13	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1	1	1	0
SMAR, Gpit 14	1	1	0	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0
SMAR, Gpit 15	0	1	0	1	1	0	0	0	1	0	1	1	0	1
SMAR, Gpit 16	1	1	0	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0
SMAR, Gpit 17	1	1	0	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0
	ID =	6												
CHOT, Conch 03	0	1	1	0	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1
CHOT, Conch 14	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0

Fuente: Elaboración propia.

Nota: Matriz binaria generada por la puntuación de bandas producidas con el marcador BJ-18

**Tabla 9****Matriz binaria para las bandas generadas con el marcador OPE-01**

/*RAPD OPE-01*/								
Numero de poblaciones= 6								
Numero de locis = 8								
Nombre de Locus:								
Muestras	L15	L16	L17	L18	L19	L20	L21	L22
	ID=	1						
CAJA,Namo-01	1	0	1	0	0	1	1	1
CAJA,Namo-02	1	0	1	0	0	0	1	1
CAJA,Namo-07	1	0	1	0	0	1	1	1
CAJA,Namo-09	1	0	1	0	0	1	1	1
CAJA,Namo-10	1	0	1	0	0	0	1	1
CAJA,Namo-12	1	0	1	0	0	1	1	1
CAJA,Namo-13	1	0	1	0	0	1	1	1
CAJA,Namo-16	1	0	1	0	0	0	1	1
CAJA,Namo-17	1	0	1	0	0	0	1	1
CAJA,Namo-18	1	0	1	0	1	1	1	1
CAJA,Namo-20	1	0	1	0	0	1	1	1
CAJA,Namo-21	1	0	1	0	0	1	1	1
CAJA,Namo-22	1	0	1	0	1	1	1	1
CAJA,Namo-23	1	0	1	0	0	1	1	1
CAJA,Namo-24	1	0	1	0	0	1	1	1
	ID=	2						
CAJA, Enca 01	1	0	1	0	0	0	1	1
CAJA, Enca 02	1	0	1	0	0	1	1	1
CAJA, Enca 03	1	0	1	0	0	1	1	1
CAJA, Enca 04	1	0	1	0	0	1	1	1
CAJA, Enca 05	1	0	1	0	0	1	1	1
CAJA, Enca 08	1	0	1	0	0	1	1	1
CAJA, Enca 10	1	0	1	0	0	1	1	1
CAJA, Enca 14	1	0	1	0	1	1	1	1
CAJA, Enca 15	1	0	1	0	1	1	1	1
CAJA, Enca 17	1	0	1	0	1	1	1	1
CAJA, Enca 19	1	0	1	0	1	1	1	1
CAJA, Enca 20	1	0	1	0	1	1	1	1
CAJA, Enca 21	1	0	1	0	1	1	1	1
CAJA, Enca 22	1	0	1	0	0	1	1	1
CAJA, Enca 23	1	0	1	0	0	1	1	1
	ID=	3						
CAJA,Llac -01	1	0	1	0	0	1	1	1
	ID=	4						
CHOT, Chal 02	1	1	1	1	0	0	1	0
	ID=	5						
SMAR, Gpit 01	1	0	1	0	1	1	1	1
SMAR, Gpit 03	1	0	1	0	1	1	1	1
SMAR, Gpit 04	1	0	1	0	0	1	1	1
SMAR, Gpit 05	1	0	1	0	0	1	1	1
SMAR, Gpit 10	1	0	1	0	0	1	1	1
SMAR, Gpit 11	1	0	1	0	1	0	1	1
SMAR, Gpit 12	1	0	1	0	1	1	1	1
SMAR, Gpit 13	1	0	1	0	1	1	1	1
SMAR, Gpit 14	1	0	1	0	0	1	1	1
SMAR, Gpit 15	1	0	1	0	0	1	1	1
SMAR, Gpit 16	1	0	1	0	0	1	1	1
SMAR, Gpit 17	1	0	1	0	0	1	1	1
	ID=	6						
CHOT, Conch 03	1	0	1	0	1	1	1	1
CHOT, Conch 14	1	0	1	0	0	1	1	1

Fuente: Elaboración propia.

Nota: Los datos se cargaron en el programa POPGENE 1.32

**Tabla 10***Matriz binaria generada por la lectura de patrones OPO-04*

/*RAPD OPO-04*/						
Numero de poblaciones = 6						
Numero de locis= 6						
nombre de locus:						
Muestras	L23	L24	L25	L26	L27	L28
	ID=	1				
CAJA,Namo-01	1	0	0	1	0	0
CAJA,Namo-02	1	1	0	1	0	0
CAJA,Namo-07	1	0	0	1	0	1
CAJA,Namo-09	1	1	0	1	0	0
CAJA,Namo-10	1	1	1	1	0	0
CAJA,Namo-12	1	1	0	1	1	1
CAJA,Namo-13	1	1	0	1	1	1
CAJA,Namo-16	1	0	1	1	0	1
CAJA,Namo-17	1	1	0	1	1	0
CAJA,Namo-18	1	1	0	1	1	0
CAJA,Namo-20	1	1	0	1	0	0
CAJA,Namo-21	1	1	0	1	1	1
CAJA,Namo-22	1	1	0	1	0	0
CAJA,Namo-23	1	1	0	1	1	1
CAJA,Namo-24	1	1	0	1	1	1
	ID=	2				
CAJA, Enca 01	1	1	0	1	0	0
CAJA, Enca 02	1	1	0	1	1	0
CAJA, Enca 03	1	1	0	1	0	1
CAJA, Enca 04	1	0	0	1	1	1
CAJA, Enca 05	1	1	0	1	1	1
CAJA, Enca 08	1	1	1	1	0	1
CAJA, Enca 10	1	1	1	1	1	0
CAJA, Enca 14	1	1	1	1	1	0
CAJA, Enca 15	1	0	1	1	1	0
CAJA, Enca 17	1	1	0	1	1	1
CAJA, Enca 19	1	1	0	1	1	1
CAJA, Enca 20	1	1	0	1	1	0
CAJA, Enca 21	1	0	0	1	1	1
CAJA, Enca 22	1	1	1	1	1	0
CAJA, Enca 23	1	1	1	1	1	0
	ID=	3				
CAJA,Llac -01	1	1	1	1	1	0
	ID=	4				
CHOT, Chal 02	1	0	0	1	1	1
	ID=	5				
SMAR, Gpit 01	1	1	0	1	1	0
SMAR, Gpit 03	1	1	0	1	0	0
SMAR, Gpit 04	1	1	1	1	1	0
SMAR, Gpit 05	1	1	0	1	1	0
SMAR, Gpit 10	1	1	0	1	1	0
SMAR, Gpit 11	1	1	0	1	0	1
SMAR, Gpit 12	1	1	0	1	0	0
SMAR, Gpit 13	1	1	0	1	0	0
SMAR, Gpit 14	1	0	0	1	1	0
SMAR, Gpit 15	1	0	0	1	1	0
SMAR, Gpit 16	1	1	0	1	0	0
SMAR, Gpit 17	1	1	0	1	0	0
	ID=	6				
CHOT, Conch 03	1	1	0	1	1	0
CHOT, Conch 14	1	1	0	1	0	0

Fuente: Elaboración propia.

Nota: En la tabla finaliza el genotipaje de *Vaccinium floribundum* Kunth.



#### 4.1 ANÁLISIS GENERAL DE TRES PRIMERS

**Tabla 11**

*Número y Porcentaje de bandas polimórficas y monomórficas detectadas en los patrones RAPD para la totalidad de ecotipos de *Vaccinium floribundum* Kunth.*

Primer RAPD's	N° Total de Bandas	Bandas monomórficas	Bandas Polimórficas	( %) Polimorfismo	Rango de peso molecular (pb)
BJ-18	14	0	14	100	400-2450
OPE-01	8	3	5	62.5	480-1500
OPO-04	6	2	4	66.67	250-1200
Total	28	5	23		
Promedio	9.3	2.5	7.6	82.14	400-2450

Fuente: Elaboración propia.

Nota: Datos obtenidos a partir del análisis de las 3 matrices binarias.

La tabla 11 permite determinar las diferencias entre los valores de número y porcentaje de bandas polimórficas y monomórficas obtenidas a partir del análisis de cada primer RAPD, evaluando el total de la población de 46 genotipos de *Vaccinium floribundum* Kunth.

Los 3 marcadores produjeron un total de 28 bandas, cada una considerada como un locus, de los cuales 23 de ellas (82.14%) fueron considerados como polimórficos.

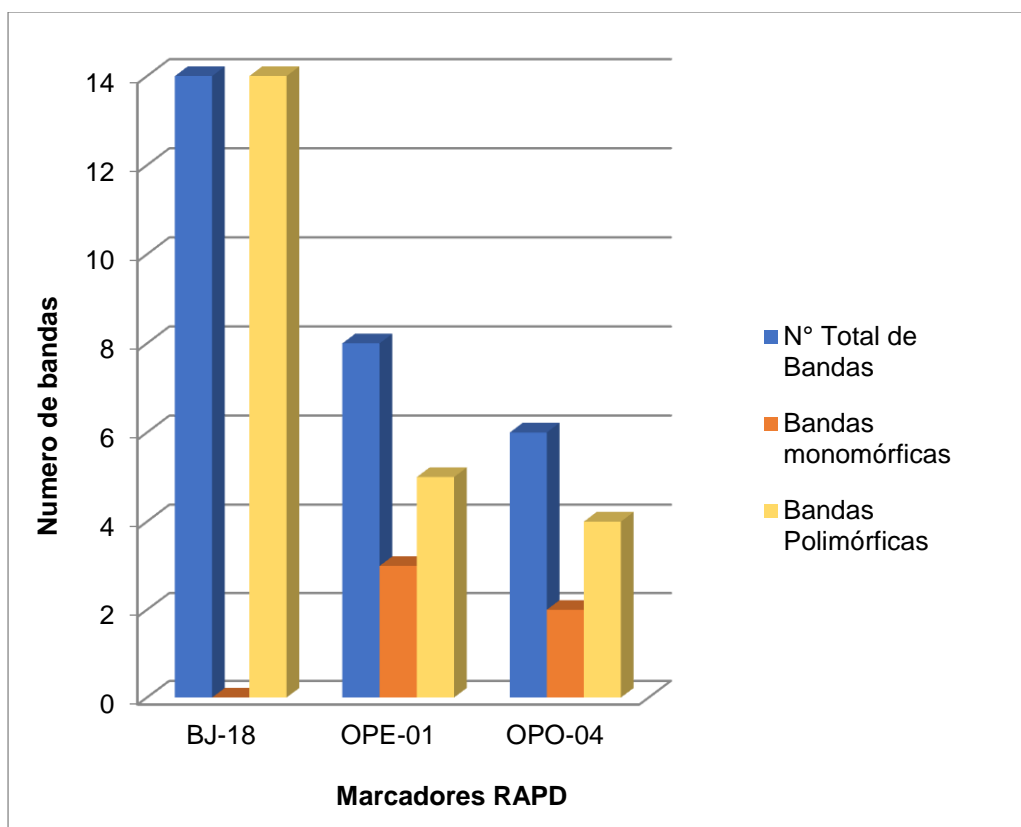
El primer BJ-18 presentó el mayor número de bandas y fue también el que presentó mayor porcentaje de polimorfismo (100%).

Los primers OPE-01 y OPO-04 generaron un menor porcentaje de polimorfismo; ambas presentaron un promedio de 2.5 bandas monomórficas, revelando bandas sin variabilidad en las poblaciones evaluadas. Para lo cual, estos marcadores probablemente podrían discriminar la especie de otras similares.

El rango de pesos moleculares producidos por los marcadores fue distinto para cada uno, con el menor peso de banda siendo 250 pares de bases (pb) del perfil de bandeado del marcador OPO-04 y con la banda de mayor peso molecular perteneciendo al marcador BJ-18 con 2450 pb.

**Figura 11**

*Relación entre los valores de total de bandas, bandas monomórficas y bandas polimórficas entre los marcadores RAPD.*



Fuente: Elaboración propia.

**Nota:** Gráfica de barras en donde se observa una marcada diferencia entre los valores del total de bandas, bandas monomórficas y bandas polimórficas en la que sobresale el marcador BJ-18.

En consecuencia a los resultados obtenidos en la tabla 11, se optó por evaluar la diversidad genética de la siguiente forma: utilizando un único marcador y utilizando un conjunto de marcadores:

Un análisis de diversidad genética utilizando un único marcador (BJ-18 con 14 locis) debido al alto porcentaje de polimorfismo que presentaba por sí misma.

Un análisis de diversidad genética del conjunto de 3 marcadores (BJ-18+OPE-01+OPO-04 con 28 locis), se debe a que los 3 marcadores presentaron niveles aceptables de polimorfismo y por representar la totalidad de locis.

#### 4.2 ANÁLISIS DE DIVERSIDAD GÉNICA INTRAPOBLACIONALES

Las estadísticas descriptivas al interior de cada población, basado en el análisis de un único marcador (BJ-18 con 14 locis) se encuentran reflejadas en la Tabla 12.

El análisis de la frecuencia génica de alelos por cada locus (14 locis) se reflejó en los parámetros de Número de Loci polimórficos y Porcentaje de loci polimórficos para cada una de las 6 poblaciones de la región Cajamarca.

**Tabla 12**

*Frecuencia génica al interior de las 6 poblaciones producido por el análisis del primer BJ-18 (14 locis).*

<b>Población</b>	<b># de loci polimórficos</b>	<b>% de loci polimórficos</b>
Namora	7	50.00%
Encañada	9	64.29%
Llacanora	0	0.00%
Chalamarca	0	0.00%
Gregorio Pita	8	57.14%
Conchan	9	64.20%

Fuente: Elaboración propia

El resultado obtenido fue el mayor número de loci polimórficos (9), con un porcentaje del 64.2% de loci polimórficos para los distritos de Encañada (perteneciente a las provincia de Cajamarca) y Conchan (perteneciente a la provincia de Chota) respectivamente, mientras que no pudo ser determinado para las poblaciones de Llacanora y Chalamarca, debido a que ambas poblaciones presentaron solo 1 ecotipo por población es probable que el análisis estadísticos no arroja resultados, al no haber con quien comparar. El menor número de loci

polimórficos y menor porcentaje de loci polimórficos lo tuvo la población de Namora (perteneciente a la provincia de Cajamarca).

Las estadísticas descriptivas al interior de cada población, basado en el análisis del conjunto de marcadores BJ-18+OPE-01+OPO-04 (28 locis) se encuentran reflejadas en la Tabla 13. De su análisis se halló la frecuencia génica de alelos por cada locus (28 locis) correspondientes a las 6 poblaciones de la región Cajamarca.

**Tabla 13**

*Frecuencia génica al interior de las 6 poblaciones producido por el análisis del conjunto de Marcadores (BJ-18+OPE-01+OPO-04)*

<b>Población</b>	<b># de loci polimórficos</b>	<b>% de loci polimórficos</b>
Namora	13	46.43%
Encañada	15	53.57%
Llacanora	0	0.00%
Chalamarca	0	0.00%
Gregorio Pita	14	50.00%
Conchan	11	39.29%

Fuente Elaboración propia.

Nota: La frecuencia génica observada es mayor en Encañada.

Como resultado, el mayor número de loci polimórficos encontrados fue de 15, es decir el mayor porcentaje de loci polimórficos 53.57% para el distrito de Encañada (perteneciente a la Provincia de Cajamarca), seguido de Gregorio Pita, Namora, mientras que no fue determinado para las poblaciones de Llacanora y Chalamarca, debido a que el tamaño de muestra de ambas poblaciones solo era de un ecotipo. El menor número de loci polimórficos se presentó en la población de Conchan. Estos resultados producidos al analizar la frecuencia génica de alelos por locus, mediante el uso del conjunto de marcadores BJ-18+OPE-01+OPO-04 (28 locis) al interior las des poblaciones testeadas.

De la Tabla 12 y 13 se determinó que la población de Encañada presenta una mayor variabilidad genética en comparación al resto. A diferencia, la población de Conchan que inicialmente presentaba una mayor frecuencia génica (tabla 12),

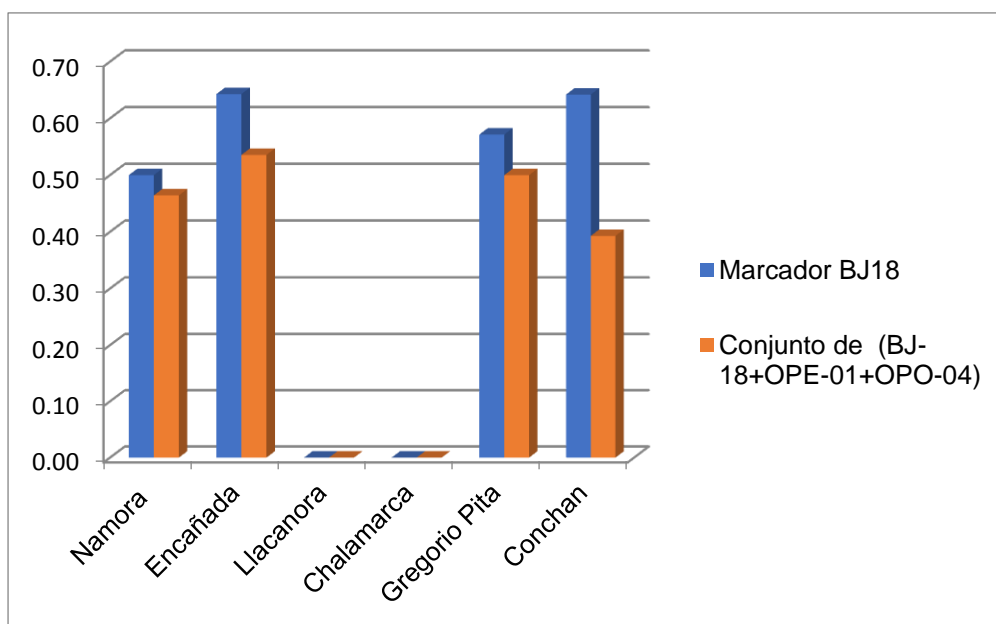
su valor se vio reducido al ser evaluada con el conjunto de marcadores (BJ-18+OPE-01+OPO-04 con 28 locis).

A partir de los datos obtenidos de las Tablas 12 y 13 se pudo realizar una gráfica de barras, el cual permite visualizar las diferencias entre los porcentajes de loci polimórficos y las diferencias en el uso de los marcadores moleculares, entre las 6 poblaciones evaluadas.

En la Figura 12, la barra de color azul refleja los porcentajes obtenidos a través de marcador BJ-18 y el color naranja, a través del conjunto de marcadores (BJ-18+OPE-01+OPO-04). Se identificó en la gráfica de barras, 2 poblaciones que no reflejaron información de % loci Polimórficos: Llacanora y Chalamarca.

**Figura 12**

*Gráfico de barras que muestra las diferencias de % de loci polimórficos de los marcadores entre las 6 poblaciones evaluadas*



Fuente: Elaboración propia.

**Nota:** Se identifica 2 poblaciones que no proporcionan información.

#### 4.3 ANÁLISIS DE DIVERSIDAD GENÉTICA A NIVEL POBLACIONES INDIVIDUALES

Se muestran un resumen de las estadísticas de variación génica para todos los loci en las tablas 13 (BJ-18 con 14 locis) y 14 (BJ-18+OPE-01+OPO-04 con 28 locis). Los valores presentes en las tablas corresponden a la media de los

parámetros de diversidad genética (tales como Numero de alelos observados, Número efectivo de alelos, coeficiente de diversidad de Nei y el Índice de información de Shannon) obtenida para cada población individualmente.

Se observa también que no se incluyó los datos de los parámetros de las poblaciones de Llacanora y Chalarmarca en las tablas 13 y 14, debido a que no se obtuvo valores estadísticos de ellos, se presume, al solo haber 1 individuo no se puede hacer un análisis comparativo dentro de 1 población.

**Tabla 14**

*Estadísticas de Variación génica de 14 locis (BJ-18) de solamente 4 poblaciones.*

<b>Población</b>	<b>Tamaño de Muestra</b>	<b>na *</b>	<b>ne*</b>	<b>h*</b>	<b>I*</b>
Namora	15	1.5	1.305	0.1778	0.2656
Encañada	15	1.6429	1.3797	0.2222	0.333
Gregorio Pita	12	1.5714	1.4038	0.2222	0.3239
Conchan	2	1.6429	1.6429	0.3214	0.4456

Nota: Términos de los índices obtenidos: \*na= número observado de alelos, \*ne=número efectivo de alelos, \*h=Coeficiente de diversidad genética de Nei y \*I= Índice de información de Shannon

Fuente: Elaboración Propia

En la tabla 14, se destacan los Valores de Coeficiente de diversidad genética de Nei (h), el mayor valor presentó la población de Conchan (0.3244) seguido de Encañada y Gregorio Pita (0.2222), el menor valor fue representado por la población de Namora (0.1778).

También en la tabla 14, se destacan los Valores de Índice de Información de Shannon, el mayor valor presentó la población de Conchan (0.4456) seguido de Encañada (0.333), Gregorio Pita (0.3239) y el menor valor fue representado por la población de Namora (0.1778).

Solo tratándose del análisis con el uso del marcador BJ18 altamente polimórfico, sus valores de los parámetros que la estiman la diversidad genética (Coeficiente de diversidad genética de Nei e Índice de información de Shannon)

son mayores y difieren de los valores obtenidos con el uso en conjunto de los 3 marcadores (tabla 15).

**Tabla 15**

*Estadísticas de Variación génica de 28 locis (BJ-18+OPE-01+OPO-04)*

<b>Población</b>	<b>Tamaño de Muestra</b>	<b>na*</b>	<b>ne*</b>	<b>h*</b>	<b>I*</b>
Namora	15	1.4643	1.2845	0.1663	0.2488
Encañada	15	1.5357	1.3299	0.1905	0.2837
Gregorio Pita	12	1.5	1.3044	0.1726	0.2578
Conchan	2	1.3929	1.3929	0.1964	0.2723

Nota: Términos de los índices obtenidos: \*na= número observado de alelos, \*ne=número efectivo de alelos, \*h=Coeficiente de diversidad genética de Nei y \*I= Índice de información de Shannon

Fuente: Elaboración propia

En la tabla 15, se destacan los valores de Coeficiente de diversidad genética de Nei (h), el mayor valor presentó la población de Conchan (0.1964) seguido de Encañada (0.1905), Gregorio Pita (0.1726), el menor valor fue representado por la población de Namora (0.1663).

También en la tabla 15, se destacan los valores de Índice de Información de Shannon (I), el mayor valor presentó la población de Encañada (0.2837) seguido de Conchan (0.2723), Gregorio Pita (0.2578) y el menor valor fue representado por la población de Namora (0.2488).

Los valores producto del análisis de Variación génica de 28 locis (BJ-18+OPE-01+OPO-04), se mostraron más uniformes, no reflejó mucha variación tanto para los datos de Coeficiente de diversidad genética de Nei (h) e Índices de Información de Shannon (I) de las poblaciones.

Distinto a los valores obtenidos por el análisis de Variación génica de 14 locis (BJ-18), los datos de Coeficiente de diversidad genética de Nei (h) e Índices de Información de Shannon (I) se reflejaron más desiguales y menos homogéneos.

De las tablas 14 y 15 se concluyó que la población que presenta una mayor variación génica y por ende estimar que tiene una mayor diversidad genética es la población de Encañada, seguido de la Población de Conchan, Gregorio Pita y finalmente la población de Namora presentó valores más bajos de estimación de diversidad genética, se traduce en que los genotipos dentro de la población podrían ser menos variables.

#### **4.4 ANÁLISIS DE DIVERSIDAD GENÉTICA A NIVEL MÚLTIPLES POBLACIONES**

Los valores presentes en las tablas 16 y 17 corresponden a la media de los parámetros de diversidad genética (tales como Numero de alelos observados, Número efectivo de alelos, coeficiente de diversidad de Nei y el Índice de información de Shannon) obtenida para el total de la población de *Vaccinium floribundum* Kunth. Evaluados en la investigación.



**Tabla 16**

*Variación génica de los 14 locis (BJ-18) para el total de ecotipos (46) de las seis poblaciones de Vaccinium floribundum Kunth.*

<b>Locus</b>	<b>Tamaño de Muestra</b>	<b>na*</b>	<b>ne*</b>	<b>h*</b>	<b>i*</b>
L1	46	2.0000	1.9962	0.4991	0.6922
L2	46	2.0000	1.0907	0.0832	0.1788
L3	46	2.0000	1.3478	0.2580	0.4265
L4	46	2.0000	1.7841	0.4395	0.6314
L5	46	2.0000	1.0444	0.0425	0.1047
L6	46	2.0000	1.0907	0.0832	0.1788
L7	46	2.0000	1.4032	0.2873	0.4620
L8	46	2.0000	1.2934	0.2268	0.3872
L9	46	2.0000	1.1389	0.1219	0.2411
L10	46	2.0000	1.0907	0.0832	0.1788
L11	46	2.0000	1.0444	0.0425	0.1047
L12	46	2.0000	1.8726	0.4660	0.6587
L13	46	2.0000	1.7841	0.4395	0.6314
L14	46	2.0000	1.9962	0.4991	0.6922
Media	46	2.0000	1.4270	0.2551	0.3978
Desviación Estándar		0.0000	0.3764	0.1819	0.2313

Nota: Términos de los índices obtenidos: \*na= número observado de alelos, \*ne=número efectivo de alelos, \*h=Coeficiente de diversidad genética de Nei y \*I= Índice de información de Shannon

Datos obtenidos del análisis en el Programa POPGENE 1.32

**Tabla 17**

Variación génica de 28 locis (BJ-18+OPE-01+OPO-04) para el total de ecotipos (46) de las 6 poblaciones de *Vaccinium floribundum* Kunth.

Locus	Tamaño de Muestra	na*	ne*	h*	i*
L1	46	2.0000	1.9962	0.4991	0.6922
L2	46	2.0000	1.0907	0.0832	0.1788
L3	46	2.0000	1.3478	0.2580	0.4265
L4	46	2.0000	1.7841	0.4395	0.6314
L5	46	2.0000	1.0444	0.0425	0.1047
L6	46	2.0000	1.0907	0.0832	0.1788
L7	46	2.0000	1.4032	0.2873	0.4620
L8	46	2.0000	1.2934	0.2268	0.3872
L9	46	2.0000	1.1389	0.1219	0.2411
L10	46	2.0000	1.0907	0.0832	0.1788
L11	46	2.0000	1.0444	0.0425	0.1047
L12	46	2.0000	1.8726	0.4660	0.6587
L13	46	2.0000	1.7841	0.4395	0.6314
L14	46	2.0000	1.9962	0.4991	0.6922
L15	46	1.0000	1.0000	0.0000	0.0000
L16	46	2.0000	1.0444	0.0425	0.1047
L17	46	1.0000	1.0000	0.0000	0.0000
L18	46	2.0000	1.0444	0.0425	0.1047
L19	46	2.0000	1.7344	0.4234	0.6145
L20	46	2.0000	1.3478	0.2580	0.4265
L21	46	1.0000	1.0000	0.0000	0.0000
L22	46	2.0000	1.0444	0.0425	0.1047
L23	46	1.0000	1.0000	0.0000	0.0000
L24	46	2.0000	1.4593	0.3147	0.4943
L25	46	2.0000	1.5158	0.3403	0.5236
L26	46	1.0000	1.0000	0.0000	0.0000
L27	46	2.0000	1.9097	0.4764	0.6693
L28	46	2.0000	1.8304	0.4537	0.6461
Media	46	1.8214	1.3539	0.2131	0.3306
St. Dev		0.3900	0.3625	0.1895	0.2601

Nota: Términos de los índices obtenidos: \*na= número observado de alelos, \*ne=número efectivo de alelos, \*h=Coeficiente de diversidad genética de Nei y \*I= Índice de información de Shannon

Datos obtenidos del análisis en el Programa POPGENE 1.32

Los datos de la media de los parámetros de diversidad genética generados en la tabla 16 y 17, fueron depositados en la tabla 18 para visualizar un mejor análisis.

Se llevó a cabo el análisis de variación génica de los 14 locis (BJ-18) y 28 locis (BJ-18+OPE-01+OPO-04) para el total de genotipos de *Vaccinium floribundum* Kunth. Se estableció una tabla resumen de las estadísticas de variación génica para todos los loci a partir de los datos mostrados en la tabla 15 y 16.

**Tabla 18**

*Estadísticas de variación génica de los 14 y 28 locus analizados para el total ecotipos de Vaccinium floribundum Kunth.*

<b>Locus</b>	<b>Tamaño de Muestra</b>	<b>na*</b>	<b>ne*</b>	<b>h*</b>	<b>I*</b>
14 locis	46	2	1.427	0.2551	0.3978
28 locis	46	1.8214	1.3539	0.2131	0.3306

Nota: Términos de los índices obtenidos: \*na= número observado de alelos, \*ne=número efectivo de alelos, \*h=Coeficiente de diversidad genética de Nei y \*I= Índice de información de Shannon

Fuente: Elaboración propia

En la Tabla 18, se pudo observar un promedio de Número observado de alelos (na) de 2, a partir del análisis de 14 locis, este valor es mayor al obtenido a partir del análisis de 28 locis (1.8214) para el total ecotipos de *Vaccinium floribundum* Kunth.

También se observó un promedio de Número efectivo de alelos (ne) de 1.427, dato generado a partir del análisis de 14 locis. El dato es mayor al obtenido a partir del análisis de 28 locis (1.3539) para el total ecotipos de *Vaccinium floribundum* Kunth.

Siguiendo el orden, se visualizó los Valores de Coeficiente de diversidad genética de Nei (h) presentes en la tabla 18, el mayor valor se reportó con el análisis de 14 locis (0.2551). El menor valor fue generado a partir del análisis de 28 locis (0.2131). Estos Valores podrían estimar que los ecotipos de *Vaccinium floribundum* Kunth. de las poblaciones de la región Cajamarca, en general, presenta una moderada variabilidad genética

Siguiendo la línea, se destacan los valores de Índice de Información de Shannon (I), el mayor valor se generó con el análisis de 14 locis (0.3978) y el menor valor fue obtenido a partir del análisis de 28 locis (0.3306), para el total ecotipos de *Vaccinium floribundum* Kunth.

En consecuencia, se concluyó que el análisis de 14 locis (BJ-18) generó una mayor variación génica que lo expuesto por análisis de 28 locis (BJ-18+OPE-01+OPO-04) analizados para el total ecotipos de *Vaccinium floribundum* Kunth.

De lo anterior, es correcto suponer que el marcador Bj-18 con 14 locis tiene un alto potencial discriminante permitiéndonos determinar una mayor diversidad genética.

#### **4.5 ANÁLISIS DE DIVERSIDAD Y DIFERENCIACIÓN GENÉTICA ENTRE POBLACIONES**

Para realizar el análisis de diversidad y diferenciación genética entre poblaciones, serán agrupadas de acuerdo a su lugar de pertenencia en 3 grupos poblacionales:

Grupo 1: Cajamarca: Namora, Encañada y Llacanora

Grupo 2: Chota: Chalamarca y Conchan

Grupo 3: San Marcos: Gregorio Pita.

**Tabla 19**

Valores del análisis de la diversidad genética según Nei en poblaciones subdivididas, mediante 14 locis (marcador BJ-18) para seis poblaciones

Locus	Tamaño de muestra	Ht	Hc	Hs	Gst	Gcs	Nm(Gst)	Nm(Gcs)
L1	46	0.4996	0.3244	0.4282	0.1429	0.2426	3.0000	1.5611
L2	46	0.2923	0.0207	0.1884	0.3556	0.8899	0.9062	0.0619
L3	46	0.2703	0.1959	0.2415	0.1064	0.1889	4.1985	2.1475
L4	46	0.3832	0.2829	0.3374	0.1196	0.1616	3.6817	2.5948
L5	46	0.2778	0.0000	0.1667	0.4000	1.0000	0.7500	0.0000
L6	46	0.3750	0.0833	0.1250	0.6667	0.3333	0.2500	1.0000
L7	46	0.2741	0.2036	0.2660	0.0293	0.2346	16.5432	1.6313
L8	46	0.1292	0.0995	0.1242	0.0388	0.1988	12.3846	2.0156
L9	46	0.3859	0.1041	0.1467	0.6197	0.2907	0.3068	1.2200
L10	46	0.3750	0.0833	0.1250	0.6667	0.3333	0.2500	1.0000
L11	46	0.2778	0.0000	0.1667	0.4000	1.0000	0.7500	0.0000
L12	46	0.3331	0.1956	0.2341	0.2973	0.1646	1.1820	2.5385
L13	46	0.3805	0.2970	0.3545	0.0683	0.1621	6.8207	2.5843
L14	46	0.4550	0.3115	0.4430	0.0263	0.2969	18.4974	1.1840
Media	46	0.3363	0.1573	0.2391	0.2891	0.3422	1.2295	0.9610
St. Dev		0.0085	0.0136	0.0125				

Nota: Términos de los índices obtenidos Nm = estimación de flujo de genes de Gst o Gcs Ht = Diversidad genética total, Hs =Media de diversidad genética intrapoblacional y Gst= Coeficiente de diferenciación genética entre poblaciones

Nota: Datos obtenidos del análisis en el Programa POPGENE 1.32

Los datos estadísticos serán producidos a partir de los análisis con 1 solo marcador BJ-18 (14 locis) y el conjunto de 3 marcadores (BJ-18+OPE-01+OPO-04 (28 locis)) evaluados al total de los ecotipos de *Vaccinium floribundum* Kunth.

Se estableció una tabla resumen (Tabla 21) con los datos de la media productos del análisis de diversidad y diferenciación genética entre poblaciones mediante 14 locis (BJ-18) y 28 locis (BJ-18+OPE-01+OPO-04); para el total de genotipos de *Vaccinium floribundum* Kunth. a partir de los valores obtenidos en las tablas 19 y 20.

**Tabla 20**

Valores del análisis de la diversidad genética según Nei en poblaciones subdivididas, mediante 28 locis, conjunto de 3 marcadores (BJ-18+OPE-01+OPO-04) para seis poblaciones de *Vaccinium floribundum* Kunth.

Locus	Tamaño de muestra	Ht	Hc	Hs	Gst	Gcs	Nm(Gst)	Nm(Gcs)
L1	46	0.4996	0.3244	0.4282	0.1429	0.2426	3.0000	1.5611
L2	46	0.2923	0.0207	0.1884	0.3556	0.8899	0.9062	0.0619
L3	46	0.2703	0.1959	0.2415	0.1064	0.1889	4.1895	2.1475
L4	46	0.3832	0.2829	0.3374	0.1196	0.1616	3.6817	2.5948
L5	46	0.2778	0.0000	0.1667	0.4000	1.0000	0.7500	0.0000
L6	46	0.3750	0.0833	0.1250	0.6667	0.3333	0.2500	1.0000
L7	46	0.2741	0.2036	0.2660	0.0293	0.2346	16.5432	1.6313
L8	46	0.1292	0.0995	0.1242	0.0388	0.1988	12.3846	2.0156
L9	46	0.3859	0.1041	0.1467	0.6197	0.2907	0.3068	1.2200
L10	46	0.3750	0.0833	0.1250	0.6667	0.3333	0.2500	1.0000
L11	46	0.2778	0.0000	0.1667	0.4000	1.0000	0.7500	0.0000
L12	46	0.3331	0.1956	0.2341	0.2973	0.1646	1.1820	2.5385
L13	46	0.3805	0.2970	0.3545	0.0683	0.1621	6.8207	2.5843
L14	46	0.4550	0.3115	0.4430	0.0263	0.2969	18.4974	1.1840
L15	46	0.0000	0.0000	0.0000	****	****	****	****
L16	46	0.2778	0.0000	0.1667	0.4000	1.0000	0.7500	0.0000
L17	46	0.0000	0.0000	0.0000	****	****	****	****
L18	46	0.2778	0.0000	0.1667	0.4000	1.0000	0.7500	0.0000
L19	46	0.3665	0.2829	0.3522	0.0391	0.1968	12.2831	2.0403
L20	46	0.3607	0.1114	0.2909	0.1936	0.6171	2.0829	0.3103
L21	46	0.0000	0.0000	0.0000	****	****	****	****
L22	46	0.2778	0.0000	0.1667	0.4000	1.0000	0.7500	0.0000
L23	46	0.0000	0.0000	0.0000	****	****	****	****
L24	46	0.3859	0.1530	0.3285	0.1486	0.5344	2.8644	0.4357
L25	46	0.3937	0.1440	0.2753	0.3006	0.4771	1.1633	0.5480
L26	46	0.0000	0.0000	0.0000	****	****	****	****
L27	46	0.4109	0.3030	0.3039	0.0434	0.2292	11.0156	1.6820
L28	46	0.4463	0.1914	0.4065	0.0892	0.5291	5.1023	0.4450
Mean	46	0.2824	0.1210	0.2105	0.2545	0.4253	1.4646	0.6757
St. Dev		0.0233	0.0140	0.0192				

Nota: Términos de los índices obtenidos Nm = estimación de flujo de genes de Gst o Gcs, Ht = Diversidad genética total, Hs =Media de diversidad genética intrapoblacional y Gst= Coeficiente de diferenciación genética entre poblaciones

Nota: Datos obtenidos del análisis en el Programa POPGENE 1.32

**Tabla 21**

*Parámetros de diversidad y diferenciación genética entre poblaciones y media de los valores del Análisis de la diversidad genética según Nei en poblaciones subdivididas*

<b>Locus</b>	<b>Ht</b>	<b>Hs</b>	<b>Gst</b>	<b>Nm</b>
14	0.3363	0.2391	0.2891	1.2295
28	0.2824	0.2105	0.2545	1.4646

Nota: Términos de los índices obtenidos Nm = estimación de flujo de genes de Gst o Gcs, Ht = Diversidad genética total, Hs =Media de diversidad genética intrapoblacional y Gst= Coeficiente de diferenciación genética entre poblaciones

Fuente: Elaboración propia

En la tabla 21, se observa un valor promedio de diversidad genética total (Ht) de 0.3363 con el análisis de 14 locis (BJ-18), este valor es mayor al obtenido con el análisis de 28 locis (BJ-18+OPE-01+OPO-04) es de 0.2824.

El mayor valor de Hs (Media de diversidad genética intrapoblacional) con el análisis de 14 locis (BJ-18) es de 0.2391 y, este valor es mayor al obtenido con el análisis de 28 locis (BJ-18+OPE-01+OPO-04) de 0.2105. Los valores no reflejan grandes diferencias significativas entre ambos datos.

El valor de diferenciación genética entre poblaciones (Gst) del análisis para ambos marcadores es relativamente alto, con el análisis de 14 locis su valor resulta en 0.2891, éste valor dispara el valor estimado de flujo Génico (1.2295) lo cual indicaría un posible caso de deriva génica. Respalda la posición, con el análisis de 28 locis (BJ-18+OPE-01+OPO-04) el valor de Gst es de 0.2545. El valor de Gst obtenido demuestra que si hay diferenciación génica entre los 3 grupos poblacionales (Grupo 1 Cajamarca: Namora, Encañada y Llacanora; Grupo 2 San Marcos: Gregorio Pita y Grupo 3 Chota: Chalarmarca y Conchan). Esta situación probablemente se deba al hecho que las poblaciones se encuentran separados geográficamente, lo que permitiría su grado de diferenciación genética entre las poblaciones de *Vaccinium floribundum* Kunth.

Los valores de  $G_{st}$  obtenidos aproximaron valores de 1.2295 y 1.4646 de flujo génico, lo que indicaría que estas poblaciones mantienen un moderado grado de intercambio genético. Dado que el valor de  $N_m$  es mayor a 1, esta condición sugiere que las poblaciones se comportan como una metapoblación.

#### 4.6 ANÁLISIS DE IDENTIDAD GENÉTICA Y DISTANCIA GENÉTICA

**Tabla 22**

*Medidas originales de Nei de Identidad Genética y Distancia Genética Nei (1972), a partir del análisis de 14 locis (BJ-18)*

<b>Poblaciones</b>	<b>Namora</b>	<b>Encañada</b>	<b>Chalamarca</b>	<b>Gregorio Pita</b>	<b>Conchan</b>
<b>Namora</b>	*****	0.9674	0.4411	0.9647	0.8638
<b>Encañada</b>	0.0331	*****	0.4698	0.9276	0.8816
<b>Chalamarca</b>	0.8184	0.7555	*****	0.3915	0.5636
<b>Gregorio Pita</b>	0.0360	0.0752	0.9379	*****	0.8603
<b>Conchan</b>	0.1464	0.1260	0.5734	0.1505	*****

Nota: Identidad genética de Nei (arriba de la diagonal) y distancia genética (debajo de la diagonal).

Fuente: Elaboración propia

En la tabla 22, se observa que no se ha incluyó a la población de Llacanora en este análisis ya que solo se contó con solo un ecotipo y se hubiera encontrado resultados sesgados por la poca representatividad de individuos con las otras 2 poblaciones (Namora y Encañada, ambas de la provincia de Cajamarca).

Datos interesantes de Identidad Genética de Nei, que involucran a poblaciones más similares genéticamente, se puede destacar la mayor similitud entre las poblaciones de Encañada y Namora (ambos de la Provincia de Cajamarca). Seguido de población de Gregorio Pita de la Provincia de San Marcos, que es más similar genéticamente a la población de Namora. Se establece una menor similitud genética entre las poblaciones de Gregorio Pita (provincia de San Marcos) y Chalamarca (provincia de Chota).



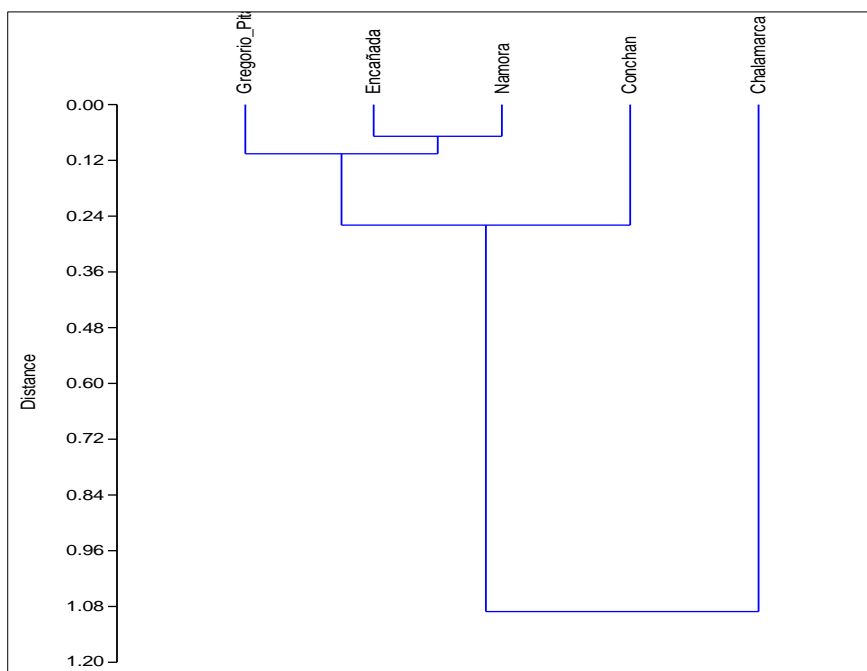
En la misma tabla 22, se evidencian valores de distancia genética entre las poblaciones, de esta manera observamos el mayor valor de distancia genética entre las poblaciones de Gregorio Pita (provincia de San Marcos) y Chalamarca (provincia de Chota). El menor valor de distancia genética entre poblaciones se estableció entre las poblaciones de Namora y Encañada (ambos de la Provincia de Cajamarca).

No hubo diferencias significativas en los valores obtenidos de los análisis de Identidad Genética y Distancia Genética de Nei (1972) con el uso del conjunto de marcadores (28 locis) para las cinco poblaciones de *Vaccinium floribundum* Kunth. Obteniendo los valores proporcionales a los hallados por el análisis del marcador BJ-18 (14 locus), la mayor similitud entre las poblaciones de Conchan y Gregorio Pita. Así como una menor similitud genética entre la población de Gregorio Pita y Chalamarca. Mientras que la mayor distancia genética se estableció entre las poblaciones de Chalamarca y Gregorio Pita, la menor distancia genética fue establecida entre las poblaciones de Gregorio Pita y Conchan.

## 4.7 ANÁLISIS DE AGRUPAMIENTO

**Figura 13**

*Dendrograma basado la matriz de similaridad genética obtenida (Tabla 22) realizado a través del software PAST (Hammer et al. 2001)*



Nota: Se observan las agrupaciones conformadas por las poblaciones más similares genéticamente.

Fuente: Elaboración Propia.

Siendo las poblaciones de Namora y Encañada de la provincia de Cajamarca, Gregorio Pita de la provincia de San Marcos y las poblaciones de Conchan y Chalamarca de la provincia de Chota, podemos indicar en la observación del dendrograma, un primer agrupamiento entre las poblaciones de Namora y Encañada (Ambas de la Provincia de Cajamarca). Las poblaciones antes mencionadas junto con la población de Gregorio pita forman un subgrupo relativamente más cercano genéticamente. Bastante más alejados se encuentran las poblaciones de la provincia de Chota.

Más distantes genéticamente y alejado de las demás poblaciones, se encuentra la población de Chalamarca. Este resultado podría estar afectado por la distancia geográfica de las localidades pertenecientes a la región de Cajamarca.

Para evitar un sesgo mayor, el hecho de haber retirado a la población de Llacanora permitió un mejor entendimiento del análisis de agrupamiento.

**Tabla 23**

*Valores obtenidos a partir de la prueba general de neutralidad de Ewens-Watterson*

Locus	n	K	Obs. F	Min F	Max F	Mean*	SE*	L95*	U95*
L1	46	2	0.5009	0.5000	0.9575	0.7773	0.0261	0.5009	0.9575
L2	46	2	0.9168	0.5000	0.9575	0.7832	0.0251	0.5038	0.9575
L3	46	2	0.7420	0.5000	0.9575	0.7680	0.0266	0.5009	0.9575
L4	46	2	0.5605	0.5000	0.9575	0.7838	0.0257	0.5038	0.9575
L5	46	2	0.9575	0.5000	0.9575	0.7796	0.0254	0.5038	0.9575
L6	46	2	0.9168	0.5000	0.9575	0.7745	0.0265	0.5009	0.9575
L7	46	2	0.7127	0.5000	0.9575	0.7827	0.0255	0.5038	0.9575
L8	46	2	0.7732	0.5000	0.9575	0.7744	0.0264	0.5009	0.9575
L9	46	2	0.8781	0.5000	0.9575	0.7792	0.0272	0.5009	0.9575
L10	46	2	0.9168	0.5000	0.9575	0.7710	0.0262	0.5038	0.9575
L11	46	2	0.9575	0.5000	0.9575	0.7832	0.0258	0.5009	0.9575
L12	46	2	0.5340	0.5000	0.9575	0.7797	0.0252	0.5009	0.9575
L13	46	2	0.5605	0.5000	0.9575	0.7773	0.0259	0.5038	0.9575
L14	46	2	0.5009	0.5000	0.9575	0.7811	0.0263	0.5009	0.9575

Nota: Estadística evaluada usando 1000 muestras simuladas.  
 Datos obtenidos del análisis en el Programa POPGENE 1.32

Según la tabla 23, los resultados para F en promedio de 0.77, para el total de la población.

Cada uno de los locus se encuentra dentro del intervalo de confianza al 95%, este resultado sugiere que los locus no están ligados a características influenciadas por presión de selección.

## V. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Este trabajo es el primer reporte del uso de marcadores de ADN RAPD para evaluar la diversidad genética en poblaciones de *Vaccinium floribundum* Kunth. “Pushgay”, acorde a los análisis los ecotipos de las 6 localidades presentan una moderada variabilidad genética. Cobo, A. (2014) en su Tesis *Estudio de Diversidad Genética de “Mortño” (Vaccinium floribundum Kunth.) en tres provincias de la Sierra Ecuatoriana: Imbabura, Pichincha y Cotopaxi*, referenció también una moderada variabilidad Genética.

Gawronski *et al.* (2017) determinaron al primer BJ-18 como uno de los cebadores que producían un alto número de fragmentos polimórficos y repetibles, durante su investigación de diversidad genética de *Vaccinium corymbosum* L. este primer había sido previamente usado también por Wach *et al.* (2016). Por otro lado, en nuestra investigación se obtuvo un menor número de bandas polimórficos (9) así como diferentes valores de número total de bandas y rango de peso molecular (400-2450pb) correspondiente solo al análisis de 46 ecotipos de *Vaccinium floribundum* Kunth.

Carvalho *et al.* (2014) utilizaron los cebadores RAPDs OPE-01 y OPO-04, en su trabajo de Fingerprinting de cultivos de *Vaccinium corymbosum* además de otros primers como OPI-07, obteniendo patrones de bandeo que permitieron la caracterización de los cultivos de Blueberry. Resaltamos los 2 primers (OPE-01 y OPO-04), estos permitieron discriminar los 46 Ecotipos en nuestro estudio, mientras que para el marcador OPI-07, no se tuvo el mismo resultado, al contrario, no se definió una temperatura de hibridación óptima para los ciclos de PCR, desde que se usaron una serie de temperaturas en la que se incluía la literatura tomada como referencia. Con el uso de los 2 primers (OPE-01 y OPO-04), los valores de rango de peso molecular reportados por los autores mencionados líneas arriba, generaron bandas de mayor peso molecular (400 -2000pb) a comparación de nuestros valores obtenidos (250-1500pb).

El porcentaje de loci polimórficos no pudo ser determinado para las poblaciones de Llacanora y Chalamarca. Debido a que presentaron solo un

individuo por población. Justamente son estas poblaciones las que se muestran más distantes genéticamente del resto. Lo que podría sugerir que las diferencias tan marcadas se deben a un sesgo de muestreo, dado el número reducido de individuos de algunas poblaciones. Autores como Lijun y Xuexiao (2012) y Oyama *et al.* (2006) mencionan que los resultados del análisis de diversidad genética están influenciados por el tipo de marcador utilizado y número de muestras analizadas. La información revisada fue acertada ya que al finalizar la investigación, se pudo concluir que la población de Encañada presenta una mayor variabilidad genética en comparación al resto de poblaciones. En contraste, la población de Conchan que inicialmente presentaba una mayor frecuencia génica su valor se vio reducido al ser evaluada con un mayor número de locis (conjunto de marcadores (BJ-18+OPE-01+OPO-04 con 28 locis).

El índice de información de Shannon es de 0.397 para el análisis del marcador BJ18, este valor es menor al reportado por Gawronski *et al.* 2017, quienes obtuvieron un valor promedio de 0.5, al trabajar con *Vaccinium corymbosum*. Sin embargo, el valor obtenido en el presente estudio es superior al valor reportado por Zoratti *et al.* 2015, quienes trabajaron con 32 entradas de bayas silvestres de *Vaccinium myrtillus*, reportando un valor promedio de 0.11 a 0.24.

Los resultados de los análisis de agrupamiento del presente trabajo indican que los ecotipos que se encuentran más cerca geográficamente presenta una mayor similitud genética, con respecto a los ecotipos que se encuentran más distantes, se obtiene para ambos análisis (el grupo de tres marcadores y solo de BJ-18) un mismo resultado, una mayor similitud genética entre las poblaciones de Namora y Encañada (ambas de la provincia de Cajamarca) y la mayor distancia genética ocurre entre las poblaciones de los distritos de Gregorio Pita y Chalamarca mas separados geográficamente. Estos resultados sugieren una real diferencia genética posiblemente debido a la posibilidad de polinización cruzada o transporte de semillas, lo que explicaría una homogeneidad entre las poblaciones en periodos de tiempo grandes. Esto podría indicar que hay una cierta relación entre la distribución geográfica y la diversidad genética, cuanto más alejado se encuentren geográficamente, mayor será la distancia genética entre ellas.

En distintas investigaciones se ha notado el uso de marcadores RAPDs para estimaciones de Diversidad genética pero consideran complementar con

estudios en base de marcadores ISSR, dado que esta última, genera una mayor cantidad de bandas con altos niveles de polimorfismos. Pero aun así, considero que esta investigación al realizar los análisis de ecotipos mediante marcadores moleculares RAPDs permitieron identificar marcadores específicos para *Vaccinium floribundum* Kunth. Sienta las bases para futuras investigaciones en el ámbito molecular y poder conocer un poco más la información genética de la potencial baya de *Vaccinium floribundum* Kunth.

Los resultados servirían como una herramienta base en programas de mejoramiento de arándanos silvestre de la región de Cajamarca.

## VI. CONCLUSIONES

La diversidad genética de ecotipos de *Vaccinium floribundum* Kunth "Pushgay" de la región Cajamarca fue estimada con el uso marcadores moleculares RAPDs, acorde a los valores obtenidos, refleja una moderada variabilidad genética entre las poblaciones.

La investigación estableció 3 marcadores RAPDs (BJ-18, OPO-04 y OPE-01) con alta capacidad de discriminación entre individuos de las 6 poblaciones evaluadas.

El marcador molecular BJ-18, fue el mejor al evaluar la diversidad genética de los ecotipos de las 6 poblaciones evaluadas de *Vaccinium floribundum* Kunth "Pushgay" con un porcentaje de loci polimórficos es de 100%.

## VII. RECOMENDACIONES

Es recomendable optimizar el Master mix y mejorar la resolución de patrones de banda, para luego verificar si el marcador permite discriminar a *Vaccinium floribundum* Kunth de otra especie hermana.

Para los marcadores con patrones de bandeo de baja resolución se recomienda realizar una optimización de master mix por cada una de ellas, dado que, si se realizó un test de temperatura, de las que en ninguna temperatura amplificó, por ende, se puede incrementar el contenido de las reacciones para estos primers. Se debería optimizar los valores de Master mix, incrementar el magnesio a 2mM y la cantidad de ADN, así como las condiciones de programas de PCR en el Termociclador

Se recomienda también realizar un secuenciamiento del genoma y un análisis de ploidía de esta especie en particular dado que esto permitiría conocer un poco más las características moleculares que representa, así como seguir con la línea de investigación sobre mejoramiento genético de esta baya silvestre.

Se recomienda realizar un análisis genético de poblaciones con un mayor número de ecotipos por población.



## VIII. REFERENCIAS

- Albert, T., Raspé, O. y Jacquemart, A., (2003) Clonal Structure in *Vaccinium myrtillus* L. Revealed by RAPD and AFLP Markers. *International Journal of Plant Sciences*, 164 (4), 649-655.
- APG IV, (2016). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 181, 1–20.
- Arteaga, L. (2017). *Análisis de cuatro marcadores RAPD´s en 41 accesiones de aguacate (Persea sp.)*. (Tesis de post grado). Universidad Autónoma del Estado de México, México. Recuperado de <http://ri.uaemex.mx/handle/20.500.11799/68290>
- Bardakci, F. (2001). Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Markers. *Turkish Journal of Biology*, 25, 185-196.
- Boches, P., Bassil, N. y Rowland, L. (2006). Genetic diversity in the highbush blueberry evaluated with microsattelite markers. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 131 (5), 674-686.
- Bornet, B. y Branchard M. (2001). Nonanchored Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) Markers: Reproducible and Specific Tools for Genome Fingerprinting. *Plant Molecular Biology Reporter*. 19, 209-215.
- Carvalho, M., Matos, M. y Carnide, V. (2014). Fingerprinting of *Vaccinium corymbosum* cultivars using DNA of fruits. *Horticultural Science*. 41 (4); 175–184.
- Cole, T., Hilger, H., Stevens, P. y Medan, D. (2019) Filogenia de las Angiospermas – Sistemática de las plantas con flores.
- Cobo, A. (2014). *Estudio de Diversidad Genética de Mortiño (Vaccinium floribundum Kunth.) en tres Provincias de la Sierra Ecuatoriana: Imbabura, Pichincha y Cotopaxi* (Tesis de pregrado). Universidad de San Francisco de Quito, Ecuador.
- Cornide, M. (2000). Molecular Characterization of the Sugarcane Variability for Genetic Improvement. *Developments in Plant Genetics and Breeding*, 5, 49-61.
- Debnath, S. (2005). Differentiation of *Vaccinium* Cultivars and Wild clones using RAPD markers. *J. Plant Biochemistry & Biotechnology*, 14, 173–177.

- Debnath, S. (2007). Inter Simple Sequence repeat (ISSR) to assess genetic diversity in a collection of wild lingonberry (*Vaccinium vitis-idaea* L.) clones. *Canadian Journal of Plant Science*, 87, 337-344.
- Debnath, S. (2014). Molecular markers in biodiversity of *Vaccinium* and *Rubus* wild Germplasm. *Acta Horticulturae*, (1017), 85–92.
- DeWet (1981). Origins of polyploids. En: *Polyploidy: Biological relevance*. W. Lewis (Ed.). Plenum Press. New York. pp. 3-15.
- Domínguez, O., Rodríguez, A., García, F. y Casas, A. (2020). La Biodiversidad en Michoacán. Estudio de Estado: CONABIO.
- Ferreira, M. y Gratapaglia, D. (1998). Introducción al uso de marcadores moleculares en análisis genético. Brasilia, Brasil. 3ª Edición, EMBRAPA — CENARGEN.
- Gawronski, J., Kaczmarek, E. y Dyduch-Sieminska, M. (2017). Assessment of Genetic Diversity between *Vaccinium corymbosum* L. cultivars using RAPD and ISSR markers. *Acta Scientiarum Polonorum Hortorum Cultus*, 16 (3); 129-140.
- Genoma Database for *Vaccinium* (GDV). Arándano. Recuperado de <https://www.vaccinium.org/crop/blueberry>.
- Haghghi, K. y Hancock, J. (1992) DNA restriction fragment length variability in genomes of high-bush blue-berry. *HortScience*, 27, 44-47.
- Hammer, O., Harper, D. y Ryan, P. (2001). Past: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontologia Electronica*. Recuperado de <http://palaeo-electronica.org>
- Jiménez, P. y Collada, C. (2000). Técnicas para la evaluación de la diversidad genética y su uso en los programas de conservación. *Investigación agraria. Sistemas y recursos forestales*, 9 (2), 237-248.
- Kron, K., Powell, E. y Luteyn, J. (2002) Phylogenetic relationships within the blueberry tribe (Vaccinieae, Ericaceae) based on sequence data from MATK and nuclear ribosomal ITS regions, with comments on the placement of *Satyria*. *American Journal of Botany*, 89(2), 327–336.
- Lijun, O. y Xuexiao, Z. (2012) Inter simple sequence repeat analysis of genetic diversity of five cultivated pepper species. *African Journal of Biotechnology*, 11, 752-757.
- López, E., Mostacero, J., Mejía, F., Díez, M., De la Cruz, C., Rodríguez, M., Zavaleta, Carmen., y Gonza, A., (2014). Registro del género *Vaccinium* en el norte del Perú. *Pueblo Continente*; 25 (2), 73-80.

- Medina, C., Pretel, O., Urquiaga, T., Torres, P., Villanueva, C. (2015). Efecto hepatoprotector de *Vaccinium floribundum* HBK “pushgay” (Ericaceae) frente al estrés oxidativo inducido con tetracloruro de carbono. *The Biologist*, 13(2),235-247
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: The polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 51:263–273.
- Nei, M. (1973). Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 70, 3321-3323.
- Nei, M., y Li, W. (1979). Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76, 5269-5273.
- Nuñez, C. y Escobedo, D. (2011). Uso correcto del análisis Clúster en la caracterización del Germoplasma Vegetal. *Agronomía Mesoamericana*. 22, 415-427.
- Oyama, K., Hernández, S., Sánchez, C., Gonzales, A., Sánchez, P., Garzón, J., y Casas, A. (2006). Genetic structure of wild and domesticated populations of *Capsicum annum* (Solanaceae) from northwestern Mexico analyzed by RAPDs. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 53, 553-562.
- Pico Sirvent MB, Pérez del Castro AM (2008) Marcadores moleculares basados en PCR: Marcadores RAPD (Random amplified polymorphic DNA). Fragmentos de ADN polimórficos amplificados al azar.1-10.

Recuperado desde: <http://hdl.handle.net/10251/17047>

- Rentarías-Alcántara M. (2007). Breve revisión de los marcadores moleculares. En *Ecología Molecular* (541-566). Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático: SEMARNAT. México.
- Rodríguez, A., Castellanos, O. y Acevedo, G. (2007). Propagación In Vitro de *Enterolobium cyclocarpum* (guanacaste) a partir de explantes nodales de Plantulas Axénicas. *e-GnosiS*, 5(8), 1-14
- Roldán, S. (2012) *Caracterización molecular, funcional y estudio del comportamiento post cosecha del mortiño (Vaccinium floribundum Kunth) de la comunidad de Quinticusig del cantón Sigchos de la provincia de Cotopaxi*. (Tesis de pregrado). Escuela Politécnica Nacional, Quito, Ecuador.
- Rowland, L., Mehra, S., Dhanaraj, A., Ogden, E., Slovin, J., Ehlenfeld, M. (2003). Development of EST-PCR markers for DNA fingerprinting and genetic

relationship in blueberry (*Vaccinium*, section *Cyanococcus*), *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 128, 682-692.

- Seminario, J. (2004). Introducción al recuento de cromosomas somáticos en raíces andinas. (6). En: J. Seminario (ed.). *Raíces Andinas: Contribuciones al conocimiento y a la capacitación*. Serie: Conservación y uso de la biodiversidad de raíces y tubérculos andinos: Una década de investigación para el desarrollo (1993-2003) No. 6. Universidad Nacional de Cajamarca, Centro Internacional de la Papa, Agencia Suiza para el Desarrollo y la Cooperación. Lima, Perú. p. 1-38.
- Sleumer, H. (1941). *Vaccinioideen –Studien*. Anuarios botánicos de sistemática, historia de las plantas y geografía de las plantas, 71, 375-510.
- Stebbins, G. (1971). *Chromosomal evolution in higher plants*. Edward Arnold LTD, Londres, 87-89.
- Tapia, M. & Fries, A. (2007). Guía de campo de los cultivos andinos. FAO y ANPE. Lima. Ed. *Milenium Digital*. (pp. 119-121).

Recuperado de: <http://www.fao.org/3/ai185s/ai185s00.htm>

- Vasco, C., Rihinen, K., Ruales, J., Kamal-Eldin, A. (2009). Chemical composition and phenolic compound profile of mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 57: 8274–8281.
- Velasco, R., (2005). Marcadores moleculares y la Extracción de ADN. *Bioteología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 3(5), 14-18.
- Wach, D., Gawronski, J., Dyduch-Sieminska, M., Kaczmarska, E. y Blazewicz-Wozniak, M. (2016). Phenotypic and Genotypic variability of cultivars of highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) grow in the Lublin region. *Acta Scientiarum Polonorum Hortorum Cultus*, 15 (6); 305-319.
- Wang, Z., Weber, J., Zhong, G. y Tanksley, S. (1994) Survey of plant short tandem repeats. *Theoretical and Applied Genetics*. 88, 1-6.
- Williams. J., Kubelik, A., Livak, K., Rafalski, J., Tingey, S. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, 18, 6531–6535.
- Yeh, F., Yang, R. y Boyle, T. (1999). POPGENE v1.31. University of Alberta and Centre for International Forestry Research. Canada.
- Zoratti, L., Palmieri, L., Jaakola, L., Häggman, H. (2015). Genetic diversity and population structure of an important wild berry crop. *AoB Plants*. 7, plv117.

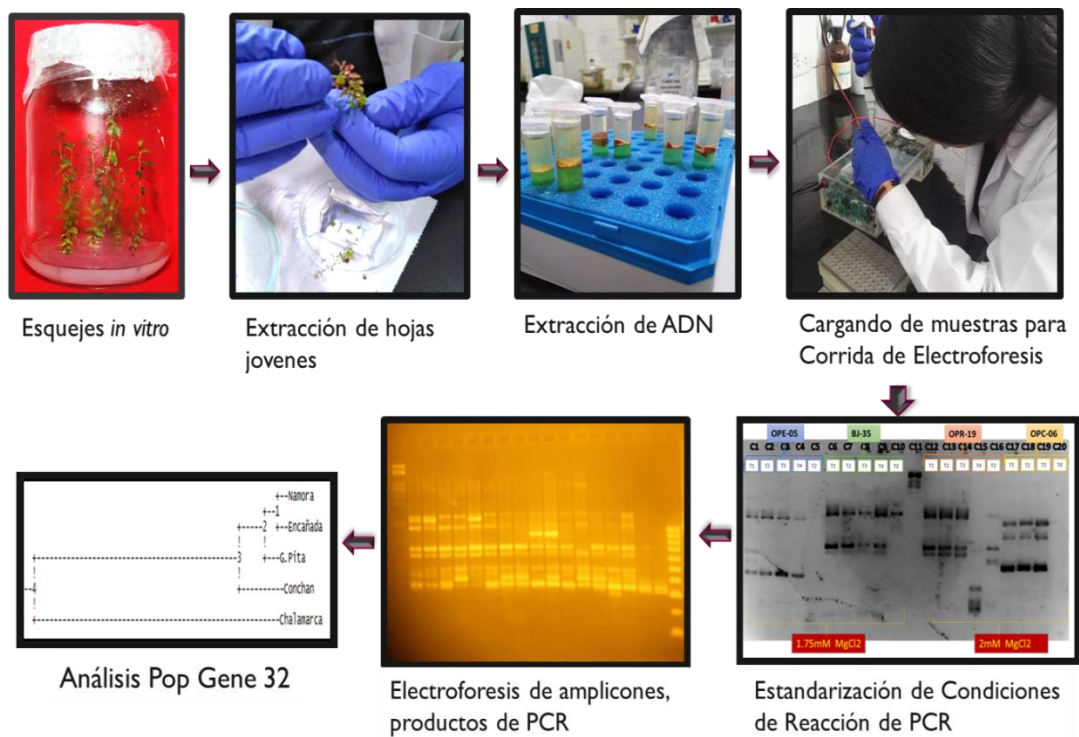


### 9.3 Anexo



Ilustración 3. Instrumento utilizado para Electroforesis, Fuente de alimentación.

### 9.4 Anexo 4



Esquema 1. Detalles del Procedimiento realizado representado uno a uno las acciones tomadas durante la investigación.