



**FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA**

ANÁLISIS DE LA DIVERSIDAD GÉNÉTICA DE LAS VARIEDADES DE OLIVO

(*Olea europaea* L.) CULTIVADAS EN LA PROVINCIA DE TACNA - PERÚ

**Línea de investigación:**

**Genética, bioquímica y biotecnología**

Trabajo Académico para optar el Título de Segunda Especialidad en  
Genética y Biología Molecular

**Autor (a):**

Cama Zamudio, César Adolfo

**Asesor (a):**

Salas Asencios, Ramsés  
(Orcid: 0000-0002-4075-1736)

**Jurado:**

López Bulnes, Jorge Luis  
Velarde Vílchez, Mónica Margarita  
Mayanga Herrera, Ana Lucia

**Lima - Perú**

**2021**

**Referencia:**

Cama, C. (2021). Análisis de la diversidad genética de las variedades de olivo (*Olea europaea* L.) cultivadas en la Provincia De Tacna - Perú. [Trabajo Académico de segunda especialidad, Universidad Nacional Federico Villarreal]. Repositorio Institucional UNFV. <http://repositorio.unfv.edu.pe/handle/UNFV/5508>



**Reconocimiento - No comercial - Sin obra derivada (CC BY-NC-ND)**

El autor sólo permite que se pueda descargar esta obra y compartirla con otras personas, siempre que se reconozca su autoría, pero no se puede generar obras derivadas ni se puede utilizar comercialmente.

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>



**FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA**

**ANÁLISIS DE LA DIVERSIDAD GÉNÉTICA DE LAS VARIEDADES DE OLIVO (*Olea europaea* L.) CULTIVADAS EN LA PROVINCIA DE TACNA - PERÚ**

**Línea de Investigación: Genética, bioquímica y biotecnología**

**Trabajo Académico para optar el Título de:**

**Segunda Especialidad en Genética y Biología Molecular**

**Autor:**

Cama Zamudio, César Adolfo

**Asesor:**

Salas Asencios, Ramsés  
(Orcid: 0000-0002-4075-1736)

**Jurado:**

López Bulnes, Jorge Luis  
Velarde Vílchez, Mónica Margarita  
Mayanga Herrera, Ana Lucia

**Lima - Perú**

**2021**

### **Agradecimientos**

En primer lugar agradecer al Dr. César Fernando López Bonilla, por brindarme el apoyo y comprensión como docente y como ser humano, sin su ayuda no hubiese sido posible la realización de este trabajo. Agradecer a la Universidad Nacional Agraria la Molina por ser inspiración de mejora continua y esfuerzo para todos los alumnos que egresamos de ella. Finalmente agradecer al Mg. Ramsés Salas Asencios por su asesoría y paciencia.

## Índice

	<b>Pág.</b>
<b>Resumen</b>	<b>4</b>
<b>Introducción</b>	<b>6</b>
<b>Metodología</b>	<b>15</b>
<b>Resultados</b>	<b>18</b>
<b>Conclusiones</b>	<b>26</b>
<b>Recomendaciones</b>	<b>27</b>
<b>Referencias Bibliográficas</b>	<b>28</b>
<b>Anexos</b>	<b>31</b>

## Resumen

La identificación de géneros y especies a través de la tecnología del ADN es una práctica común para establecer diferencias a nivel genético entre individuos que están dentro de una misma especie; pero que por algún tipo de presión evolutiva comienzan a mostrar cambios a nivel de sus secuencias nucleotídicas encontradas en su ADN. Estos cambios pueden ser usados como marcadores que permitan definir si se está frente a una nueva variedad que pertenece a una determinada zona de cultivo, en un determinado ámbito geográfico de un país o región (denominación de origen) y que al relacionarse estas variedades con características de interés económico del cultivo puedan incrementarse las utilidades en toda la cadena productiva. En el presente trabajo académico se realizó la caracterización molecular (ADN) de los principales cultivares de *Olea europea L.* que se cultivan en la provincia de Tacna usando marcadores AFLP (*Amplified Fragment length polymorphism*), donde se encontró una distancia genética alta entre las variedades Ascolana y Coratina (0.2323) y se determinó una mayor diversidad genética de las variedades de olivo estudiadas en los locus (L): L6, L20, L33, y L89 con índices de diversidad de Nei de 0.4945, 0.4986, 0.4937 y 0.4989 respectivamente.

**Palabras clave:** ADN, AFLP, PCR, marcador molecular, locus.

## Abstract

The identification of genera and species through DNA technology is a common practice to establish differences at the genetic level between individuals that are within the same species; but due to some kind of evolutionary pressure, they begin to show changes at the level of their nucleotide sequences found in their DNA. These changes can be used as markers that allow defining whether it is a new variety that belongs to a certain growing area, in a certain geographical area of a country or region (denomination of origin) and that when these varieties are related to characteristics economic interest of the crop can increase profits throughout the production chain. In the present academic work, the molecular characterization (DNA) of the main cultivars of *Olea Europea L.* grown in the province of Tacna was carried out using AFLP (Amplified Fragment length polymorphism) markers, where a high genetic distance was found between the varieties Ascolana and Coratina (0.2323) and a greater genetic diversity of the olive varieties studied was determined at loci (L): L6, L20, L33, and L89 with Nei diversity indices of 0.4945, 0.4986, 0.4937 and 0.4989 respectively.

**Key words:** AND, AFLP, PCR, molecular marker, locus.

## I. INTRODUCCIÓN

### 1.1. Descripción del problema

El árbol de olivo es uno de los árboles frutales de gran importancia económica y con mayor antigüedad en cuanto a su cultivo en países mediterráneos. Sus productos, el aceite de oliva y las aceitunas de mesa son importantes componentes de la dieta mediterránea y también son apreciados y consumidos a nivel mundial (Ercisli *et al.*, 2009).

Los primeros olivos en llegar a Suramérica lo hicieron vía Lima- Perú con los colonizadores españoles (Contreras y Tapia, 2016) y el cultivo se estableció principalmente en los departamentos de Ica, Arequipa y Tacna en donde los frutos se destinaron principalmente al consumo directo como aceitunas de mesa (Guevara y Eloy, 2011). De los departamentos mencionados, fue en Tacna donde se fue concentrando la mayor cantidad de área de este cultivo. Con el tiempo el olivo, al ser una especie introducida, se ha ido adaptando a las condiciones climáticas, edafológicas y de manejo propias del lugar de crecimiento que difieren de las que se encuentran en su lugar de origen.

El olivo es un cultivo que posee muchas variedades o ecotipos generados por hibridaciones interespecíficas entre las diversas especies del género *Olea*. De acuerdo a los mejores caracteres agronómicos algunos fueron seleccionados y clonados a través del tiempo y del espacio. Al llegar al nuevo mundo estas especies tuvieron que desarrollar tolerancia y



adaptación a estreses abióticos, climáticos y edáficos propios del lugar en donde crecen (Cavagnaro *et al.*, 2001).

En el Perú los lugares donde se cultiva olivo son los departamentos de Ica, Arequipa y Tacna, siendo este último el que concentra la mayor producción con 69 254 toneladas para el año 2017 (Dirección Regional de Agricultura de Tacna, 2017) en los cuatro valles dedicados a esta actividad: Locumba, Sama, y la Yarada.

La región Tacna posee un clima de tipo desértico con escasas precipitaciones en el invierno de tipo garua, originadas por las densas neblinas que se levantan en el litoral y fluyen hacia las pampas. En cuanto a la temperatura sus meses más calurosos son enero y febrero con un promedio de 20 °C mientras que los más fríos son julio y agosto con 12 °C (Haen *et al.*, 1963).

De acuerdo a la estudiado por Haen *et al.* (1963), los suelos de la región Tacna son del tipo franco arenoso, de drenaje moderado y con un pH ligeramente alcalino; con una baja cantidad de materia orgánica y alta producción de sales solubles como cloruros y sulfatos. La irrigación de las tierras cultivadas se realiza con agua corriente superficial y también con agua subterránea provenientes del bombeo de pozos.

Las principales variedades de olivo cultivadas en el Perú son la sevillana, ascolana y liguria de las cuales se destinan los frutos para la elaboración de aceite y para el consumo directo. En tal sentido, los agricultores realizan hibridaciones entre individuos de la misma

especie basándose en características tales como tamaño de fruto, tiempo de cosecha, entre otras para mejorar los rendimientos de producción del fruto y también para dar destino a la elaboración de aceite o al consumo directo. Estas formas de seleccionar individuos y de establecer y/o generar variedades que respondan a la expectativa del agricultor y a la del mercado requieren un soporte objetivo y científico para discriminar entre variedades cultivadas en el país (Guevara y Eloy, 2011).

Así uno de los principales problemas a resolver es la determinación de variedades a la que pertenecen los cultivares de olivo que son producidas por los agricultores, quienes no tienen un conocimiento científico definido sobre si los individuos que hibridan tienen genes distintos que lleven a conseguir una característica deseada (tamaño de fruto, resistencia a sequías, cantidad de materia grasa, entre otras); lo que usualmente se consigue basándose solamente en características morfológicas y agronómicas en general, que muchas veces no tienen contraparte genética y que pueden llevar a esfuerzos infructuosos de tiempo y dinero.

Definir las características genéticas y fenotípicas de los cultivos de olivo en el Perú permitiría establecer una denominación de origen de nuestras variedades y así diferenciarlas de aquellas provenientes de países vecinos y de los distintos productos alimenticios, naturales y elaborados que se pueden derivar. De esta manera se evitaría apropiaciones indebidas sobre el origen del producto y sus derivados.

Para poder otorgar al agricultor un conocimiento científico claro sobre la variabilidad genética de los ecotipos que cultivan y se desarrollan en sus respectivas áreas geográficas, es

necesario llevar a cabo un estudio de diversidad genética vegetal que permita diferenciar a nivel molecular los distintos cultivares que crecen en la provincia de Tacna. Al tener este conocimiento, sobre las diferenciaciones moleculares de sus variedades, el agricultor podrá realizar de manera sistemática los cruces respectivos entre individuos que posean las características deseadas por él y cuya base está en sus patrones de ADN.

## **1.2. Antecedentes**

Según Manzur y Alanoca (2012), el procurador del Perú Antonio de Ribera trajo plantas de olivo desde Sevilla (España) y desde aquel entonces fueron cultivadas en los valles de Azapa y Huasco (Arica), por esos años territorios pertenecientes al Perú. De aquí que una de las principales variedades de olivo que se cultivan en el sur del Perú y al norte de Chile sea la variedad sevillana.

Guevara y Eloy (2011), mencionan que las variedades de olivo en el Perú son en gran parte de origen europeo y que provienen especialmente de España, Italia y Portugal. Entre las principales variedades de olivo que crecen en el Perú se tienen: la ascolana, gordal, manzanilla, pendolino, sevillana y liguria.

Los marcadores que se encuentran a nivel de ADN se fundamentan en las variaciones que se encuentran en una determinada longitud del material genético. Las técnicas que se basan en estas variaciones se pueden agrupar en categorías: la primera en la que no se usa la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), como RFLP (*restriction fragment length polymorphism*) y

VNTR (*variable number tandem repeats*); la segunda que utiliza cebadores arbitrarios como por ejemplo AFLP (*amplified fragment length polymorphism*) y finalmente la tercera en la que se tiene sitios específicos para la PCR, como por ejemplo SSR (*simple sequence repeats*), (Karp, *et al.*, 1997).

Tapia *et al.* (2015) señalan que, en los niveles productivos de los olivos, es necesario tener en cuenta que las cantidades de aceite que presentan los distintos ecotipos están relacionadas con un componente genético que se asocia a los rendimientos grasos, tanto en húmedo como en seco, de los frutos de olivo.

En un estudio realizado en Argentina, Cavagnaro *et al.* (2001), compararon los productos de amplificación RAPD (*random amplified polymorphic*) de 7 variedades de olivo cultivadas en este país frente a los productos de amplificación RAPD de las mismas variedades nominales cultivadas en España. Solo una de las variedades cultivadas en Argentina compartió el mismo patrón de bandas RAPD, mientras que las restantes compartieron menos del 90 % de similitud, indicando que los cultivos de olivo crecidos en Argentina presentan genotipos distintos a los que son cultivados en España.

Bracci *et al.* (2011), señalan que la AFLP, una técnica molecular que no requiere un conocimiento previo de las secuencias de ADN, es muy útil en la detección de polimorfismos entre genotipos cercanos. La AFLP consiste en la doble digestión de ADN genómico con dos enzimas de restricción. Los fragmentos generados son ligados con adaptadores y son sometidos a una primera amplificación por PCR, para luego volver a someterse a una PCR selectiva que

depende de la unión de una secuencia complementaria a los adaptadores usados para unirse a los fragmentos de restricción.

Angiolillo *et al.* (1999), realizaron un estudio en donde utilizaron la técnica AFLP para visualizar la variación genética dentro y entre las poblaciones del género *Olea*. Las poblaciones cultivadas o domesticadas, los olivos silvestres y los cultivos pertenecientes al noroeste de África formaron agrupamientos cercanos con un nivel de similitud de 0.56; mientras que las especies de África del este y de Asia formaron distintos agrupamientos. Finalmente, se mostró una gran diversidad entre las especies que crecían cerca del océano indico y las que venían de Australia.

Un estudio en 29 cultivares de olivo fue realizado en Túnez, usando marcadores AFLP, donde se encontraron 410 marcadores, entre los cuales 172 revelaron un alto grado de polimorfismo. Además, se obtuvo un rango de similitud genética del 0,454 al 0,917, revelando un alto grado de variación de la diversidad genética entre los cultivares de olivo usados en este estudio (Grati-Kamoun *et al.*, 2006).

Sanz-Cortés *et al.* (2003), compararon 10 variedades de olivo, usando el análisis AFLP para demostrar variación entre las especies y dentro de las especies; encontrando la formación de 10 agrupamientos correspondiendo a las 10 variedades usadas en el análisis. La similitud entre las variedades estuvo en orden de 0,60 a 0,72; mientras que la diversidad dentro de las variedades fue demostrada en esta investigación.

A nivel de Sudamérica, Contreras y Tapia (2016), llevaron a cabo una investigación en 7 variedades de olivo, para identificar genéticamente la variedad de olivo sevillana que crece en Chile, a través de marcadores ISSR (*inter simple sequence repeats*), obteniendo 153 marcadores de los cuales 130 exhibían polimorfismos, obteniendo 3 bandas exclusivas para la variedad sevillana de crecimiento en suelo chileno. Con lo cual concluyeron que la variedad sevillana que crece en Chile es diferente de las variedades estudiadas provenientes de España.

### **1.3. Objetivos**

#### **1.3.1. Objetivo General**

Analizar la diversidad genética de las variedades de olivo (*Olea europaea L.*) cultivadas en la provincia de Tacna - Perú, usando marcadores AFLP.

#### **1.3.1 Objetivos específicos**

- Determinar los coeficientes de distancia genética de Nei entre cada una de las once variedades de olivo cultivadas en la provincia de Tacna.
- Determinar las distancias genéticas entre las 11 variedades de olivo cultivadas en la provincia de Tacna a través del coeficiente de Nei.
- Determinar la diversidad genética entre las variedades de olivo cultivadas en la provincia de Tacna mediante el índice de diversidad genética de Nei (h).

### **1.4. Justificación e importancia**

El presente trabajo académico se justifica en la necesidad de saber si las variedades de olivo (*Olea europaea L.*) que se cultivan en el departamento de Tacna se diferencian a nivel genotípico entre ellas. Esto gravitaría en la selección de la variedad mejor adaptada a las condiciones particulares del lugar donde se cultiva lo cual mejoraría el rendimiento de la producción del fruto, así como se podría asociar el genotipo a características de calidad del fruto tanto para la producción de aceite como también para el consumo directo. Finalmente, al establecer un genotipo que se desarrolla en un determinado ambiente geográfico se podría establecer una denominación de origen que permita diferenciar los cultivos nacionales de aquellos provenientes de países vecinos.

## **1.5. Impactos esperados del trabajo académico**

### ***1.5.1. Impacto económico:***

Al saberse que las distintas variedades de olivo que crecen en Tacna difieren genéticamente podrán identificarse los fenotipos de interés económico que permitan realizar cruces adecuados para mejoramiento genético, al conocerse la diferenciación a nivel molecular podrían asociarse estas diferencias a un rasgo que pueda incrementar los rendimientos de producción para las aceitunas de mesa para el consumo directo, así como el rendimiento en el grado de materia grasa lo que resultaría en mayor cantidad de aceite producido, finalmente otros rasgos que incrementen la cantidad de antioxidantes y sustancias que brindan olor y sabor más

agradables para los consumidores lo que generaría un precio más competitivo y mayores utilidades para todos los involucrados en esta actividad económica.

### ***1.5.2. Impacto metodológico:***

Al usarse una técnica basada en la tecnología de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se permitirá realizar una búsqueda rápida de los polimorfismos que exhibe el genoma de las variedades de una determinada especie vegetal. Esta metodología es altamente reproducible y no requiere tener información previa sobre las secuencias del genoma en las variedades analizadas.

Finalmente, el número de bandas generadas es amplio, lo cual generará información más abundante sobre las variedades que forman parte del análisis de diversidad genética.

### ***1.5.3. Impacto social:***

Al tener identificadas genóticamente las variedades de olivo en la provincia de Tacna se generarían puestos de trabajo que incluirían a toda la cadena productiva, desde la siembra hasta la cosecha del olivo; pasando por todas las actividades de transformación o de consumo directo, así como la exportación y el marketing de esta especie vegetal; de esta forma se involucraría una cantidad grande de gente como agricultores, industriales, profesionales y operadores que interaccionarán a diferentes niveles en todas las actividades relacionadas al olivo.



## II. METODOLOGÍA

La recolección del material genético vegetal fue realizada en la provincia de Tacna, mientras que el análisis molecular fue realizado en las instalaciones del Instituto de Biotecnología (IBT) de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Agraria la Molina (UNALM) en la provincia de Lima; cuyos datos fueron cedidos gentilmente por el Dr. César Fernando López Bonilla, responsable del área de biología molecular del IBT. Los equipos e insumos usados para los distintos procedimientos realizados fueron:

- Micropipetas 10, 20, 200, 1000 micro litros
- Termociclador
- Equipo de electroforesis
- Fuentes de poder
- Equipo de revelado manual
- Espectrofotómetro para cuantificación de ácidos nucleicos
- Vidrios adherentes y repelentes
- Centrifuga para PCR
- Agua ultra pura
- Reactivos para las técnicas PCR y AFLP
- Horno microondas
- Potenciómetro
- Balanza de precisión

En el presente trabajo académico se realizó una caracterización molecular de 11 variedades de *Olea europaea L.* cultivadas en la provincia de Tacna, Perú con un número total de muestras de 87 individuos, utilizando la técnica AFLP, con la cual se determinó un conjunto de bandas que se compararon entre sí para establecer, diferencias genotípicas entre las variedades de olivo cultivadas. Las bandas obtenidas fueron evaluadas a través de un procedimiento estadístico llamado análisis de agrupamientos en donde se estableció el grado de semejanzas entre las variedades de olivo estudiadas.

La metodología seguida para el presente trabajo académico fue la siguiente:

## **2.1 Obtención de las muestras**

Las muestras fueron obtenidas de diferentes fincas en la provincia de Tacna departamento de Tacna. Se tomaron porciones de ramas que contenían hojas jóvenes y se colocaron en bolsas de papel, rotulándose cada una por finca y variedad de olivo recolectada, luego fueron trasladadas a los laboratorios del Instituto de Biotecnología de la UNALM.

## **2.2 Extracción del ADN**

Para realizar la extracción del ADN se tomó como base la técnica de CTAB 2% (Doyle & Doyle, 1990) y se siguió el protocolo descrito por Blas *et al.* (2010), (anexo 1).

### **2.3. Caracterización de la variabilidad genética mediante AFLPs**

Para la caracterización de la diversidad se tomó como referencia la técnica AFLP (*amplified fragment length polymorphism* o amplificación de longitud de fragmentos polimórficos) descrita por Vos *et al.* (1995) y se realizó el protocolo descrito por Blas *et al.* (2010), (anexo 2).

### **2.4. Recojo y procesamiento de los datos obtenidos**

Las bandas obtenidas en gel de poliacrilamida fueron convertidas en datos binarios donde 0 corresponde a ausencia del alelo y 1 corresponde a la presencia del mismo. Estos datos fueron llevados a una hoja de cálculo, para luego ser convertidas en matrices numéricas a través del programa NTSYSpc 2,2 con el que se realizó la determinación de las distancias genéticas y los índices de similitud de las variedades de olivo.

### III. RESULTADOS

#### 3.1. Resultados esperados

Por ejemplo, Angiolillo *et al.* (1999), determinaron la diversidad genética del olivo que crece en regiones África, India y Australia encontrando una amplia diversidad.

Sanz-Cortés, *et al.* (2003) determinaron la diversidad genética de 10 cultivares de olivo encontrando sendas diferencias y similitudes entre todas las variedades participantes del estudio.

También Rao *et al.* (2009), hallaron relaciones genéticas y caracterizaron diversidad de cultivares de olivo en la región sur de Italia.

Ipek *et al.* (2015), usando un análisis de regresión múltiple acompañado de un análisis previo con AFLP lograron determinar asociaciones significativas entre los marcadores AFLP y presencia de tocoferoles en el fruto de olivo.

En el presente trabajo académico se esperaba obtener diferencias genéticas entre las 11 variedades de olivo cultivadas en la provincia de Tacna a través de distintos marcadores moleculares AFLP.

## **3.2. Resultados obtenidos**

### ***3.2.1 Cuantificación del ADN extraído***

Se realizó la extracción del ADN de acuerdo a la técnica de CTAB 2% (Doyle & Doyle, 1990) y se siguió el protocolo descrito por Blas *et al.* (2010) para luego realizar una electroforesis y evaluar la integridad del ADN extraído (anexo 3) a la vez que se realizó una cuantificación (ng /  $\mu$ l) a través de un espectrofotómetro. Los resultados pueden observarse en la tabla N° 1.

### ***3.2.2 Análisis de bandas obtenidas por AFLPs***

Luego de realizar la amplificación selectiva se obtuvo una serie de bandas en gel de poliacrilamida (anexo 4) las cuales fueron transcritas a una matriz binaria donde la presencia de la banda para cada individuo fue codificada con el número 1 y la ausencia de la misma con el número 0 para cada una de las variedades analizadas en el presente trabajo (tabla N° 2). Esta matriz fue analizada con el programa bioinformático NTSYSpc 2,2 para variabilidad genética obteniéndose los siguientes indicadores:

### **A. Distancia y similitud genética de Nei**

Se obtuvo la distancia y similitud genética de Nei entre cada una de las variedades estudiadas (Tabla N° 3), donde los números arriba de la diagonal corresponden a similitud y los que están debajo de la misma a la distancia genética. De la misma forma se realizó un análisis de agrupamiento no ponderado usando medias aritméticas para obtener un dendograma de las variedades de olivo analizadas (anexo 5).

### **B. Diversidad genética de Nei (h)**

En la Tabla número 4 se observa la diversidad genética de Nei en términos de heterocigocidad (h) para cada uno de los locus analizados.

### **C. Diferenciación genética interpoblacional para diferentes locus ( $G_{st}$ ), diversidad genética intrapoblacional ( $H_s$ ), diversidad genética total ( $H_t$ ) y flujo génico ( $N_m$ ).**

En la Tabla número 5 se observan los principales indicadores resultantes del análisis interpoblacional.

**Tabla 1:***Cantidad de ADN obtenido en la extracción.*

Número	Variedad	concentración (ng/ul)
1	Sevillana	750
2	Pendolina	2000
3	Ascolana	2000
4	Frantollo	3000
5	Empeltre	700
6	Fargal	1000
7	Coratina	2000
8	Arvequina	2000
9	Picholine	1000
10	Manzanilla	2000
11	Azapa	2000

Nota: Elaboración propia (2018).

**Tabla 2:***Número de individuos analizados y codificación por variedad*

Número	Variedad	Individuos por variedad	Código
1	Sevillana	32	S1, S8, S9, S10, S11, S17
2	Pendolina	6	S2
3	Ascolana	6	S3
4	Frantollo	5	S4
5	Empeltre	5	S5
6	Fargal	4	S6
7	Coratina	6	S7
8	Arvequina	8	S12, S13
9	Picholine	7	S14, S15
10	Manzanilla	3	S16
11	Azapa	3	S18

Nota: Elaboración propia (2019).

**Tabla 3:***Medida de similitud y distancia genética de Nei*

pop	SEVILLANA	AZAPA	PENDOLINA	ASCOLANA	FRATOLLO	EMPELTRE	FARGAL	CORATINA	ARVEQUINA	PICHOLINE	MANZANILLA
SEVILLANA	****	0.9803	0.8392	0.9177	0.8529	0.8552	0.8279	0.8505	0.8974	0.8976	0.8692
AZAPA	0.0199	****	0.8214	0.8799	0.8262	0.854	0.8076	0.8314	0.8678	0.8781	0.8579
PENDOLINA	0.1753	0.1967	****	0.8423	0.8615	0.8894	0.8668	0.8401	0.8738	0.9354	0.8818
ASCOLANA	0.0859	0.128	0.1716	****	0.8096	0.8349	0.8025	0.7927	0.8578	0.8642	0.8159
FRATOLLO	0.1591	0.1909	0.149	0.2112	****	0.889	0.8749	0.9219	0.8771	0.8581	0.8705
EMPELTRE	0.1564	0.1578	0.1172	0.1805	0.1176	****	0.8803	0.9027	0.8387	0.8639	0.8268
FARGAL	0.1888	0.2137	0.143	0.22	0.1337	0.1275	****	0.9142	0.8454	0.8586	0.8226
CORATINA	0.1619	0.1847	0.1742	0.2323	0.0813	0.1023	0.0897	****	0.8719	0.8455	0.8359
ARVEQUINA	0.1082	0.1418	0.1349	0.1534	0.1311	0.1759	0.1679	0.137	****	0.9308	0.8862
PICHOLINE	0.1081	0.1299	0.0668	0.1459	0.1531	0.1463	0.1524	0.1678	0.0718	****	0.926
MANZANILLA	0.1401	0.1532	0.1257	0.2035	0.1387	0.1901	0.1953	0.1792	0.1208	0.0769	****

Nota: Elaboración propia (2018).



**Tabla 4:***Heterocigocidad para cada locus*

Locus	Sample	h	Locus	Sample	h	Locus	Sample	h	Locus	Sample	h	Locus	Sample	h
L1	87	0	L21	87	0	L41	87	0	L61	87	0	L81	87	0
L2	87	0.307	L22	87	0	L42	87	0	L62	87	0	L82	87	0.1083
L3	87	0.1284	L23	82	0.3932	L43	87	0	L63	87	0	L83	87	0
L4	87	0.0975	L24	87	0	L44	83	0.1901	L64	87	0	L84	78	0.4553
L5	87	0	L25	87	0	L45	82	0.4274	L65	87	0.4156	L85	87	0
L6	87	0.4945	L26	85	0.2244	L46	85	0	L66	87	0.167	L86	87	0
L7	87	0	L27	86	0	L47	86	0	L67	87	0.1808	L87	87	0
L8	87	0.3906	L28	83	0.243	L48	87	0	L68	87	0	L88	87	0
L9	87	0	L29	85	0.3493	L49	87	0	L69	87	0	L89	86	0.4989
L10	85	0.4742	L30	81	0.2935	L50	87	0	L70	87	0	L90	87	0
L11	87	0	L31	87	0.0547	L51	87	0	L71	84	0.4889	L91	87	0
L12	87	0	L32	87	0	L52	87	0.4809	L72	87	0	L92	87	0
L13	80	0.4291	L33	77	0.4937	L53	86	0.0887	L73	87	0			
L14	86	0.4226	L34	85	0.0897	L54	87	0	L74	87	0.1083			
L15	86	0	L35	85	0.4851	L55	87	0	L75	78	0.4671			
L16	86	0	L36	78	0.4685	L56	85	0.2752	L76	82	0.4277			
L17	86	0	L37	86	0	L57	86	0.3098	L77	87	0.4365			
L18	85	0.1998	L38	84	0	L58	87	0	L78	87	0			
L19	87	0	L39	81	0.075	L59	87	0.3473	L79	87	0			
L20	77	0.4986	L40	87	0	L60	87	0	L80	87	0			

Nota: Elaboración propia (2018).

**Tabla 5:**

*Diferenciación genética interpoblacional para diferentes locus (Gst), diversidad genética intrapoblacional (Hs), diversidad genética total (Ht) y flujo génico (Nm).*

Locus	Sample Size	Ht	Hs	Gst	Nm*	Locus	Sample Size	Ht	Hs	Gst	Nm*	Locus	Sample Size	Ht	Hs	Gst	Nm*
L1	87	0	0	****	****	L31	87	0.0715	0.0439	0.3854	0.7972	L61	87	0	0	****	****
L2	87	0.3878	0.0172	0.9557	0.0232	L32	87	0	0	****	****	L62	87	0	0	****	****
L3	87	0.1653	0	1	0	L33	77	0.494	0.1128	0.7717	0.1479	L63	87	0	0	****	****
L4	87	0.1494	0.0172	0.8851	0.0649	L34	85	0.1653	0	1	0	L64	87	0	0	****	****
L5	87	0	0	****	****	L35	85	0.4117	0.1071	0.74	0.1757	L65	87	0.2622	0.0377	0.8564	0.0838
L6	87	0.4976	0.0816	0.836	0.0981	L36	78	0.4963	0.1222	0.7538	0.1633	L66	87	0.2355	0.0455	0.807	0.1196
L7	87	0	0	****	****	L37	86	0	0	****	****	L67	87	0.2401	0.0452	0.8116	0.1161
L8	87	0.4759	0.0687	0.8556	0.0844	L38	84	0	0	****	****	L68	87	0	0	****	****
L9	87	0	0	****	****	L39	81	0.1084	0.0423	0.61	0.3196	L69	87	0	0	****	****
L10	85	0.4998	0.062	0.8759	0.0708	L40	87	0	0	****	****	L70	87	0	0	****	****
L11	87	0	0	****	****	L41	87	0	0	****	****	L71	84	0.4823	0.0452	0.9062	0.0518
L12	87	0	0	****	****	L42	87	0	0	****	****	L72	87	0	0	****	****
L13	80	0.4818	0.1328	0.7243	0.1903	L43	87	0	0	****	****	L73	87	0	0	****	****
L14	86	0.4831	0.1331	0.7246	0.1901	L44	83	0.2622	0.0377	0.8564	0.0838	L74	87	0.1653	0	1	0
L15	86	0	0	****	****	L45	82	0.2947	0.0865	0.7066	0.2076	L75	78	0.4959	0	1	0
L16	86	0	0	****	****	L46	85	0	0	****	****	L76	82	0.3681	0.0799	0.7829	0.1387
L17	86	0	0	****	****	L47	86	0	0	****	****	L77	87	0.4959	0	1	0
L18	85	0.1915	0.0268	0.8601	0.0813	L48	87	0	0	****	****	L78	87	0	0	****	****
L19	87	0	0	****	****	L49	87	0	0	****	****	L79	87	0	0	****	****
L20	77	0.5	0.1463	0.7074	0.2068	L50	87	0	0	****	****	L80	87	0	0	****	****
L21	87	0	0	****	****	L51	87	0	0	****	****	L81	87	0	0	****	****
L22	87	0	0	****	****	L52	87	0.2975	0	1	0	L82	87	0.1653	0	1	0
L23	82	0.308	0.0807	0.738	0.1775	L53	86	0.1653	0	1	0	L83	87	0	0	****	****

L24	87	0	0	****	****	L54	87	0	0	****	****	L84	78	0.489	0.0816	0.8331	0.1002
L25	87	0	0	****	****	L55	87	0	0	****	****	L85	87	0	0	****	****
L26	85	0.2306	0.0712	0.6913	0.2233	L56	85	0.2975	0	1	0	L86	87	0	0	****	****
L27	86	0	0	****	****	L57	86	0.4091	0.0826	0.7981	0.1265	L87	87	0	0	****	****
L28	83	0.2026	0.0348	0.8281	0.1038	L58	87	0	0	****	****	L88	87	0	0	****	****
L29	85	0.4443	0.079	0.8221	0.1082	L59	87	0.4559	0.0211	0.9537	0.0243	L89	86	0.3967	0	1	0
L30	81	0.3878	0.0172	0.9557	0.0232	L60	87	0	0	****	****	L90	87	0	0	****	****
												L91	87	0	0	****	****
												L92	87	0	0	****	****

Nota: Elaboración propia (2018).

#### IV. CONCLUSIONES

- Se realizó el análisis de la diversidad genética de las variedades de olivo (*Olea europaea* L.) cultivadas en la provincia de Tacna-Perú usando marcadores AFLP.
- Se determinaron los coeficientes de distancia genética de Nei entre las 11 variedades de olivo (tabla N° 3).
- Se compararon las distancias genéticas de Nei entre las 11 variedades de olivo, siendo la más alta la que se encontró entre las variedades Ascolana y Coratina (0.2323)
- Se determinó la diversidad genética de Nei (h) siendo las mayores las encontradas en los locus (L): L6 (0.4945), L20 (0.4986), L33 (0.4937) y L89 (0.4989).

## V. RECOMENDACIONES

- Se recomienda realizar estudios de asociación entre diversidad genética y rasgos de fruto, como tamaño, cantidad de materia grasa, presencia de tocoferoles, etc.
- Se recomienda realizar estudios de asociación entre diversidad genética y rasgos de resistencia como salinidad, sequia, plagas, etc.
- Se recomienda realizar el secuenciamiento genético de los polimorfismos hallados en el presente estudio.

## VI.REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Angiolillo, A., Mencuccini, M. y Baldoni, L. (1999). Olive genetic diversity assessed using amplified fragment length polymorphisms. *Theor Appl Genet.* 98: 411-421.
- Blas, R., Gutiérrez, L., Flores, J. y Berrocal A. (2010, 17 de mayo) *Biotecnología aplicada al mejoramiento genético de plantas*. [Curso]. I Congreso Peruano de Mejoramiento Genético de Plantas y Biotecnología Agrícola. Lima, Perú.
- Bracci, T., Busconi, M., Fogher, C. y Sebastiani, L. (2011). Molecular studies in olive (*Olea europaea L.*): overview on DNA markers applications and recent advances in genome analysis. *Plant Cell Rep.* 30: 449-462.
- Cavagnaro, P., Juarez, M. y Masuelli, R. W. (2001). Discriminación de variedades de olivo a través del uso de caracteres morfológicos y de marcadores moleculares. *Agriscientia.* 28: 27-35.
- Contreras, R. y Tapia, F. (2016). Identificación genética de la variedad de olivo (*Olea europaea L.*) Sevillana y su relación con variedades productivas existentes en la provincia del Huasco. *Idesia.* 34(3): 15-22.
- Dirección Regional de Agricultura de Tacna. (2017). *Olivo. Producción y Exportación Aceitunas*. Recuperado de [http://www.agritacna.gob.pe/gestores/estadistica/of\\_ol\\_estadidet\\_e/archivos/2778343429\\_4387653883.pdf](http://www.agritacna.gob.pe/gestores/estadistica/of_ol_estadidet_e/archivos/2778343429_4387653883.pdf)
- Doyle, J. J. y Doyle J.L. (1990) Isolation of Plant DNA from Fresh Tissue. *Focus.* 34(1): 13-15.
- Ercisli, S., Barut, E. y Ipek, A. (2009). Molecular characterization of olive cultivars using amplified fragment length polymorphism markers. *Genetics and Molecular Research.* 8(2): 414-419.

- Grati-Kamoun, N., Lamy, F., Rebai, A., Gargouri, A., Panaud, O. y Saar, A. (2006) Genetic diversity of Tunisian olive tree (*Olea europaea* L.) cultivars assessed by AFLP markers. *Genetic Resources and Crop Evolution*. 53: 265-275.
- Guevara, A. y Eloy, M. (2011). *Post Cosecha y Procesamiento del Olivo. Guía Técnica. UNALM-AGROBANCO*. Recuperado de <https://docplayer.es/6202025-Post-cosecha-y-procesamiento-de-olivo.html>
- Haen, H., Ortiz, G. y Wilson, J. (1963). Geología de los Cuadrángulos de la Yarada y Tacna. Geología del Cuadrángulo de Huaylillas. Recuperado de [https://repositorio.ingemmet.gob.pe/bitstream/20.500.12544/136/14/A-006-Boletin\\_Yarada-37u\\_Tacna-37v\\_Huaylillas-37x.pdf](https://repositorio.ingemmet.gob.pe/bitstream/20.500.12544/136/14/A-006-Boletin_Yarada-37u_Tacna-37v_Huaylillas-37x.pdf).
- Ipek, M., Seker, M., Ipek, A. y Gul, M.K. (2015). Identification of molecular markers associated with fruit traits in olive and assessment of olive core collection with AFLP markers and fruit traits. *Genetics and Molecular Research*. 14(1): 2762-2774.
- Karp, A., Kresovich, S., Bhat, K.V., Ayad, W.G. y Hodgkin, T. (1997). *Molecular tools in plant genetic resources conservation: a guide to the technologies*. International plant genetic resources institute. Recuperado de [https://pdf.usaid.gov/pdf\\_docs/Pnacb166.pdf](https://pdf.usaid.gov/pdf_docs/Pnacb166.pdf)
- Manzur, M.I. y Alanoca, N. (2012). Patrimonio Alimentario de Chile. *Productos y preparaciones de la región de Arica y Parinacota*. Recuperado de <http://bibliotecadigital.fia.cl/handle/20.500.11944/145549>.
- Rao, R., La Mura, M., Corrado, G., Ambrosino, O., Foroni, I., Perri, E. y Pugliano, G. (2009). Molecular diversity and genetic relationships of southern Italian olive cultivars as depicted by AFLP and morphological traits. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*. 84(3): 261-266.

- Sanz-Cortés, F., Parfitt, D.E., Romero, C., Struss, D., Llácer, G. y Badenes, L. (2003). Intraspecific olive diversity assessed with AFLP. *Plant Breeding*. 122: 173-177.
- Tapia, C., Araniti, V. y Bauzá, M. (2015). Producción de aceite de oliva “Blend” variedad sevillana como base para la denominación de origen de aceite de oliva del valle del Huasco. *Instituto de Investigaciones Agropecuarias*. 318: 15-22.
- Vos, P., Hoger, R., Bleeker, M., Reijans, M., Van de Lee T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M. y Zabeau, M. (1995). AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*. 23(21): 4407-4414.



## **VII. ANEXOS**

### Anexo A: Protocolo de extracción de ADN

- 1.** Pulverizar con nitrógeno líquido el tejido foliar colectado de preferencia de hojas jóvenes aproximadamente 200 mg.
- 2.** En un tubo eppendorf de 1,5 ml colocar material vegetal pulverizado hasta la marca de 500 µl y resuspender con 700 µl de buffer CTAB (2X), Adicionando 2 µl de β mercaptoetanol. Agitar suavemente e incubar por 30 minutos a 65 °C.
- 3.** Retirar de la incubadora y dejar reposar por espacio de 2 minutos a temperatura ambiente.
- 4.** Agregar 700 µl cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) mezclar suavemente el tubo y centrifugar 5 min a 14 000 rpm. transferir el sobrenadante a otro tubo.
- 5.** Adicionar 50 µl de CTAB (10X), mezclar suavemente para homogenizar todo el líquido.
- 6.** Adicionar 700 µl de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1), mezclar suavemente y centrifugar 5 min a 14 000 rpm. transferir el sobrenadante a otro tubo.
- 7.** Agregar  $\frac{3}{4}$  partes del volumen final (500 µl aprox.) de Isopropanol helado para precipitar el ADN. Incubar a -20 °C durante 40 min.
- 8.** Centrifugar 20 min a 12 000 rpm y descartar el sobrenadante cuidando de no perder el pellet.
- 9.** Lavar el pellet con 500 µl de Etanol al 70% helado y centrifugar 20 min a 12 000 rpm descartar el Etanol.
- 10.** Lavar el pellet con 500 µl de Etanol al 95% helado y centrifugar 20 min a 12 000 rpm descartar el Etanol.

**11.** Permitir que el ADN (pellet) se seque al aire libre por 2 horas invirtiendo el tubo y luego resuspender el ADN en 80  $\mu$ l de buffer T10E1 ó agua estéril (aproximadamente) y almacenar a -20 °C.

## Anexo B: Realización de marcadores moleculares AFLPs

La técnica involucra tres etapas: (1) restricción del DNA y ligación de los oligonucleótidos adaptadores; (2) amplificación selectiva de los grupos de los fragmentos de restricción (preamplificación y amplificación selectiva); (3) análisis de gel de los fragmentos amplificados.

### **(1) Restricción del DNA y ligación de los oligonucleótidos adaptadores**

-En un tubo de 1.5 ml añadir 10ul de DNA (50ng/ul).

-Añadir 1 µl de enzima EcoRI NEB (10,000U/ml).

-Añadir 0.50 µl de enzima MseI NEB (10,000U/ml).

-Añadir 2 µl de buffer # 2 NEB 10x.

-Añadir 2.0 µl de Suero Bovino Fetal BSA 10X (1mg/ml).

-Añadir Agua destilada suficiente para 20 µl.

-Incubar a 37 °C por 3 a 4 horas.

-Añadir 1 µl de oligonucleótido adaptador EcoRI..

-Añadir 1 µl de oligonucleótido adaptador MseI

-Añadir 2.5 µl de buffer ligasa 10X.

-Añadir 0.3 µl de enzima ligasa T4 (400000 U/ml).

-Añadir 0.2 de agua bidestilada de manera que se completa a un volumen final de 25 µl.

-Incubar a temperatura ambiente de 16 a 24 horas.

## **(2) Amplificación selectiva de los fragmentos de restricción**

La amplificación selectiva de los fragmentos incluye dos fases la preamplificación y la amplificación selectiva de los fragmentos

### **(2.1) Preparación de la muestra stock**

- Diluir las muestras digeridas y ligadas a una concentración de 1 en 5
- En un tubo de 0.2 ml añadir 5 µl de los DNA digeridos y ligados
- Añadir 20 µl de buffer T10E0

### **(2.2) Preparación Master Mix (preamplificación)**

- En un tubo de 0.2 ml añadir 14.05 µl H<sub>2</sub>O
- Añadir 2.5µl 10X PCR Buffer
- Añadir 1.25µl dNTP mix (5mM)
- Añadir 1.0µl EcoRI+0 primer (10µM)
- Añadir 1.0µl MseI+0 primer (10µM)
- Añadir 0.2µl de enzima Taq DNA polymerase
- Añadir 5µl de la muestra stock(1:5)

**(2.3) Programa de termociclador :**

ciclos	T °	t
1	72 °C	2 min
1	94 °C	4 min
22	94 °C	30 s
	56 °C	1 min
	72 °C	1 min
1	72 °C	5 min
1	4 °C	∞

**(2.4) Preparación del master mix (amplificación selectiva)**

-Los productos de preamplificación deben ser diluidos previamente en una proporción 1:4 con agua bidestilada.

-En un tubo de 0.2 ml añadir 10 ul de agua bidestilada.

-Añadir 1.1ul de 10X PCR Buffer.

-Añadir 0.6ul de dNTPs (5mM).

-Añadir 2.0ul de EcoRI+3 primer (50 ng/ul).

-Añadir 0.3ul de MseI+3 primer (50 ng/ul).

-Añadir 0.15ul de DNATaq polymerase.

-Añadir 2ul de DNA pre-amplificado (previamente diluido).

### (2.5) Programa de termociclador

ciclos	T °	t
1	94 °C	4 min
1	94 °C	20 s
1	65 °C	30 s
1	72 °C	2 min
10	94 °C	20s
	65 °C	30s
	72 °C	2min
20	94°C	20s
	56 °C	30s
	72 °C	2min
1	60 °C	30 min
1	4°C	∞

### (2.6) Preparación de las placas de vidrio y del gel de electroforesis

#### -Placa adherente

- 1: limpiar las placas de vidrio con alcohol de 70° y dejar secar
- 2: en un tubo de microcentrífuga preparar la solución de adhesión mezclando 7.5 ul de Bind Silane y 7.5 ul de ácido acético glacial concentrado en 1.5 ml de alcohol de 95%. Agitar.
- 3: esparcir la solución de adhesión sobre toda la placa de vidrio con la ayuda de papel tissue.
- 4: dejar secar a temperatura ambiente por 30 min.
- 5: remover las partículas de polvo transcurrido el tiempo, usando el papel tissue y haciéndolo en una sola dirección.

**-Placa repelente**

- 1: limpiar la placa de vidrio con alcohol de 70%.
- 2: humedecer papel tissue con solución Repel Silane y esparcirla por toda la superficie de la placa.
- 3: dejar secar a temperatura ambiente por 30 min.
- 4: remover las partículas de polvo transcurrido el tiempo, usando el papel tissue y haciéndolo en una sola dirección.

**-Ensamblaje y preparación del gel de electroforesis (poliacrilamida 6%)**

- 1: colocar los espaciadores laterales sobre la placa de vidrio (lado tratado).
- 2: sobre la primera placa colocar la segunda de manera que los lados tratados esten frente a frente.
- 3: entre las dos placas se coloca el espaciador inferior.
- 4: asegurar las esquinas y los puntos medios del sistema con abrazaderas metálicas que ejerzan igual presión en ambos lados.
- 5: probar los peines adecuados (de grosor preciso) en la parte superior del sistema.
- 6: tomar un volumen de 60 ml de solución de poliacrilamida, adicionar 38 ul de TEMED y 380 ul de persulfato de amonio al 10%, agitar suavemente, verter la solución a la placa de gel ensamblada, por una esquina, de manera continua para evitar la formación de burbujas.
- 7: colocar el peine elegido.
- 8: dejar solidificar el gel por lo menos 2 horas antes de usarlo.
- 9: retirar el peine de menara gentil.
- 10: cargar las muestras en los pocillos formados.



11: realizar la electroforesis a 1600 voltios por un espacio de 4 horas.

### **(2.7) Tinción con nitrato de plata**

#### **-Fijación del gel**

Acido acético 5ml

Alcohol puro 100ml

H2O destilada 900ml

Agitar por espacio de 20 minutos.

#### **-Tinción del gel**

Nitrato de plata 2gr

H2O destilada 1000ml

#### **-Revelado del gel**

Hidróxido de sodio 24gr

H2O destilada 800ml

Agregar solo antes de usar

Formaldehido 5ml

#### **-Fijación del gel**

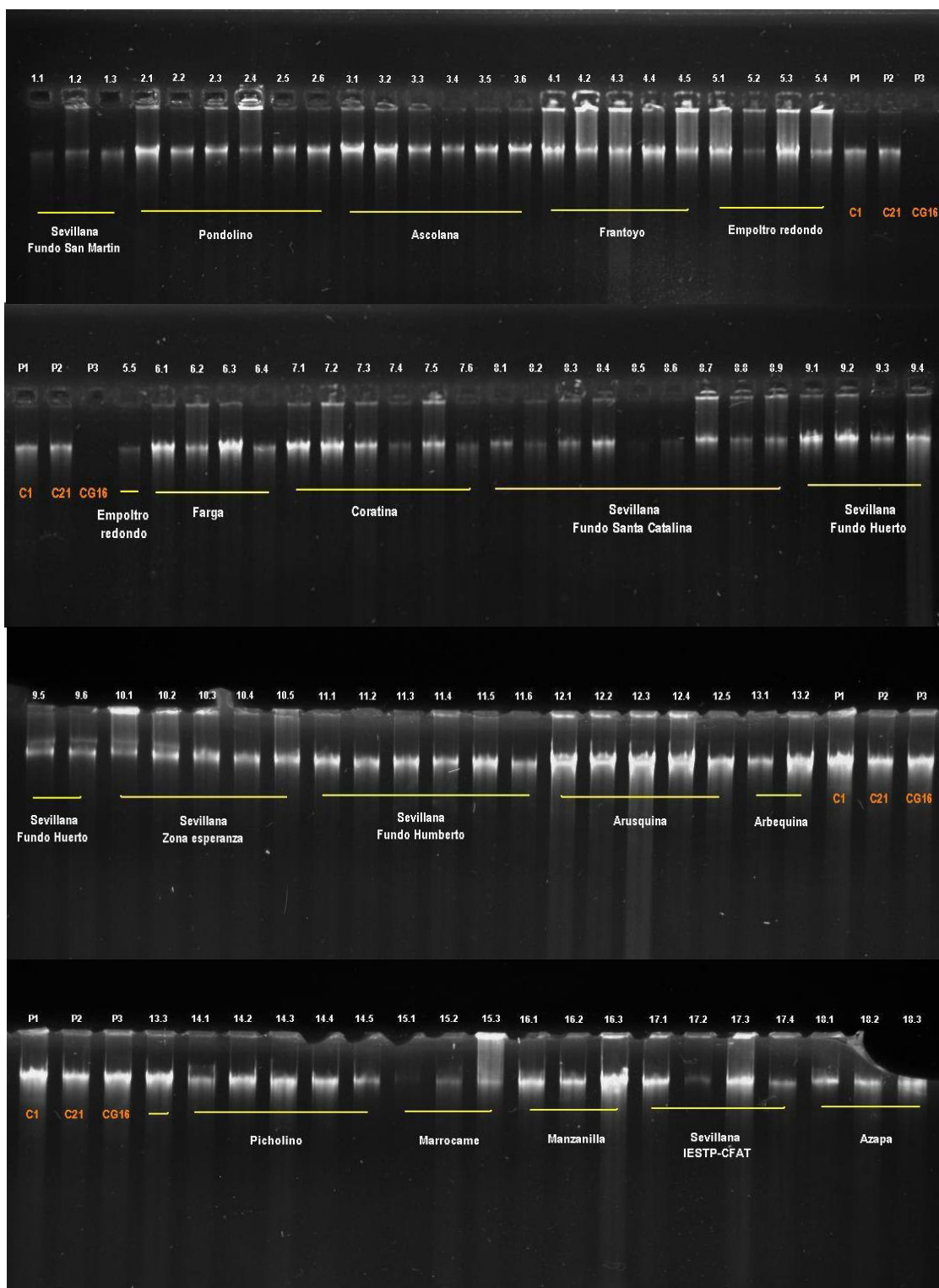
Parar la reacción con la solución de fijación.

Luego enjuagar con agua destilada y dejar secar el gel hasta su escaneo o análisis.

## Anexo C: integridad del ADN extraído de las variedades estudiadas

**Figura 1:**

*Visualización del adn extraído de las variedades estudiadas*



## Anexo D: Marcadores obtenidos usando AFLPs \*

**Figura 2***Patrones de bandas obtenidos en la electroforesis*