

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL CUSCO

FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

ESCUELA PROFESIONAL DE ZOOTECNIA



TESIS

**EVALUACIÓN DE TRES PROTOCOLOS DE EXTRACCIÓN DE ADN TOTAL EN
ESPECIES VEGETALES DE LA COMUNIDAD VEGETAL TIPO TOLAR DEL FUNDO
QENA, DISTRITO CALLALLI - AREQUIPA**

Tesis para optar Título Profesional de INGENIERO ZOOTECNISTA

Presentado por:

Bachiller en Ciencias Agrarias FRANCO
ALEXANDRO HUAMBO ORÉ.

Asesores

Ing. Zoot. Dr. ANDRÉS CORSINO
ESTRADA ZÚÑIGA

Ing. Zoot. JIM CÁRDENAS RODRÍGUEZ

CUSCO – PERÚ

2020

DEDICATORIA

A mi mamá Leni con mucho cariño, quien me dio la vida y le debo un eterno reconocimiento y admiración por sus infatigables esfuerzos y sacrificios para darme una vida feliz y una profesión.

A mi tío Ernesto con mucho cariño por ser un padre, hermano, amigo, y por darme la oportunidad de descubrir mi vocación.

A mis Abuelos Felipe y Concepción, quienes son una fuente de inspiración y sabiduría.

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi profundo agradecimiento a la Universidad San Antonio Abad del Cusco, a mi facultad de ciencias Agrarias, a todos mis docentes, compañeros y personas involucradas por ayudarme a realizar mi sueño y mi vocación como zootecnista.

Mi especial agradecimiento a mi asesor de tesis Dr. Andrés Estrada, por la confianza, exigencia y orientación para la realizar este trabajo.

Mi Agradecimiento y reconocimiento a la Ing. Yuli Roque por la orientación, tiempo dedicado e interés en este trabajo.

Mi agradecimiento y cariño a la Bióloga Minerva, por su compañía y tiempo de ayuda para concluir este trabajo.

Un agradecimiento la Ing. Martha por su amistad y ayuda en este trabajo.

Agradezco de manera especial a mi hermana Sihomara.

ÍNDICE

RESUMEN	8
SUMMARY	9
INTRODUCCION	10
PROBLEMA OBJETO DE ESTUDIO	11
OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN	12
Objetivos Generales	12
Objetivos Específicos	12
JUSTIFICACIÓN	13
CAPÍTULO I:	14
1.1 ANTECEDENTES.....	14
1.2 MARCO TEÓRICO	18
1.2.1 Pastizales.....	18
1.2.2 Clases de pastizales	19
1.2.3 Sitios de pastizales.....	19
1.2.4 Formaciones vegetales de pastizales	19
1.2.5 Formaciones vegetal tipo tolar	21
1.2.6 Importancia de formaciones vegetal tipo tolar.....	22
1.2.7 Especies vegetales colectadas de los tolares de Qena	23
1.2.8 Degradación de pastizales	32
1.2.9 Causas de la degradación de pastizales.....	33
1.2.10 El uso de la biotecnología para la conservación de la biodiversidad.....	33
1.2.11 EL ácido desoxirribonucleico (ADN).....	34
1.2.12 Importancia de la extracción de ADN	36
1.2.13 Proceso de extracción de ADN.....	37
1.2.14 Protocolo tradicional.....	43
1.2.15 Protocolo comercial.....	44
1.2.16 Protocolo comercial Purelink.....	44
1.2.17 Métodos de evaluación del ADN.....	45
1.2.18 Almacenamiento del ADN	51
1.2.19. Ventaja y desventajas de los protocolos de extracción tradicionales y comerciales.....	51
CAPÍTULO II	53
MATERIALES Y MÉTODOS	53
2.1 CAMPO DE VERIFICACIÓN	53
2.1.1 Lugar de ejecución.....	53
2.1.2 Zona de muestreo	53
2.1.3 Unidades de estudio	54
2.2 MATERIALES	55
2.2.1 Material biológico	55

2.2.2	Materiales usados para la colección de muestra	55
2.2.3	Materiales y equipos de Laboratorio para la extracción	55
2.3	METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	59
2.3.1	Recolección y transporte de muestra de las muestras.....	59
2.3.2	Procesamiento de las muestras	59
2.3.3	Protocolos de extracción de ADN	60
2.3.4	Evaluación de la pureza, concentración e integridad de ADN.....	62
2.4	DISEÑO ESTADÍSTICO	70
CAPÍTULO III		71
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....		71
3.1	Evaluación de los protocolos en relación a la concentración y pureza del ADN..	71
3.1.1	Extracción de ADN para <i>Parastrephia lepidophylla</i>	71
3.1.2	Extracción de ADN para <i>Baccharis mycrophylla</i>	73
3.1.3	Extracción de ADN para <i>Margiricarpus strictus</i>	75
3.1.4	Extracción de ADN para <i>Margyricarpus pinnatus</i>	76
3.1.5	Extracción de ADN para <i>Alchemilla pinnata</i>	77
3.1.6	Extracción de ADN para <i>Trifolium amabile</i>	79
3.1.7	Extracción de ADN para <i>Muhlenbergia fastigiata</i>	80
3.1.8	Extracción de ADN para <i>Muhlenbergia peruviana</i>	82
3.1.9	Extracción de ADN para <i>Paspalum pygmaeum</i>	83
3.1.10	Extracción de ADN para <i>Festuca orthophylla</i>	85
3.1.11	Extracción de ADN para <i>Calamagrostis vicunarum</i>	86
3.1.12	Extracción de ADN para <i>Poa candamoana</i>	87
3.1.13	Extracción de ADN para <i>Bromus sp.</i>	89
3.2	Determinación de la integridad del ADN por electroforesis en gel de agarosa	89
CAPÍTULO V		93
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES		93
CONCLUSIONES		93
RECOMENDACIONES.....		94
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS		95
ANEXOS		106

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Detergentes y denaturadores comunes usados en la extracción de ADN.....	42
Tabla 2. Cantidad de ADN obtenido para diferentes muestras usando el kit comercial PureLink.	45
Tabla 3. Ventajas y desventajas de los métodos tradicionales y comerciales de extracción y purificación de ADN.	52
Tabla 4. Especies vegetales (unidades de estudio)	54
Tabla 5. Comparación de medias de la concentración de ADN de los 3 protocolos para <i>Parastrephia lepidophylla</i>	71
Tabla 6. Comparación de medias de la concentración de ADN de los 3 protocolos para <i>Baccharis mycophylla</i>	73
Tabla 7. Comparación de medias de la concentración de ADN de los 3 protocolos para <i>Margiricarpus strictus</i>	75
Tabla 8. Comparación de medias de la concentración de ADN de los 3 protocolos para <i>Margyricarpus pinnatus</i>	76
Tabla 9. Comparación de medias de la concentración de ADN de los 3 protocolos para <i>Alchemilla pinnata</i>	78
Tabla 10. Comparación de medias de la concentración de ADN de los 3 protocolos para <i>Trifolium amabile</i>	79
Tabla 11. Comparación de medias de la concentración de ADN de los 3 protocolos para <i>Muhlenbergia fastigiata</i>	81
Tabla 12. Comparación de medias de la concentración de ADN de los 3 protocolos para <i>Muhlenbergia peruviana</i>	82
Tabla 13. Comparación de medias de la concentración de ADN de los 3 protocolos para <i>Paspalum pygmaeum</i>	84
Tabla 14. Comparación de medias de la concentración de ADN de los 3 protocolos para <i>Festuca orthophylla</i>	85
Tabla 15. Comparación de medias de la concentración de ADN de los 3 protocolos para <i>Calamagrostis vicunarum</i>	87
Tabla 16. Comparación de medias de la concentración de ADN de los 3 protocolos para <i>Poa candamoana</i>	88
Tabla 17. Comparación de medias de la concentración de ADN de los 3 protocolos para <i>Bromus sp.</i>	89

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura del ADN.....	36
Figura 2. Etapas de la técnica	39
Figura 3. BeadRuptor 12.	40
Figura 4. NanoDrop™ One/OneC Microvolume UV-Vis Spectrophotometer	47
Figura 5. Pedestales del NanoDrop.....	47
Figura 6. Qubit™ 4 Fluorometer	48
Figura 7. E-Gel™ Agarose Gels with SYBR™ Safe DNA Gel Stain, 1.2%.....	50
Figura 8. Mapa del distrito de Callalli, provincia de Cayoma.....	53
Figura 9. Gráfica del contenido de ADN genómico y relación de absorbancias (A260/280 y A260/230) de <i>Parastrephia lepidophylla</i> para cada tratamiento de extracción.	72
Figura 10. Gráfica del contenido de ADN genómico y relación de absorbancias (A260/280 y A260/230) de <i>Baccharis mycrophylla</i> para cada uno de los protocolos.	74
Figura 11. Gráfica del contenido de ADN genómico y relación de absorbancias (A260/280 y A260/230) de <i>Margiricarpus strictus</i> para cada uno de los tratamientos.	76
Figura 12. Gráfica del contenido de ADN genómico y relación de absorbancias (A260/280 y A260/230) de <i>Margyricarpus pinnatus</i> para cada uno de los tratamientos.....	77
Figura 13. Gráfica del contenido de ADN genómico y relación de absorbancias (A260/280 y A260/230) de <i>Alchemilla pinnata</i> para cada uno de los tratamientos.....	78
Figura 14. Gráfica del contenido de ADN genómico y relación de absorbancias (A260/280 y A260/230) de <i>Trifolium amabile</i> para cada uno de los tratamientos.	80
Figura 15. Gráfica del contenido de ADN genómico y relación de absorbancias (A260/280 y A260/230) de <i>Muhlenbergia fastigiata</i> para cada uno de los tratamientos.	82
Figura 16. Gráfica del contenido de ADN genómico y relación de absorbancias (A260/280 y A260/230) de <i>Muhlenbergia peruviana</i> para cada uno de los tratamientos.....	83
Figura 17. Gráfica del contenido de ADN genómico y relación de absorbancias (A260/280 y A260/230) de <i>Paspalum pygmaeum</i> para cada uno de los tratamientos.	85
Figura 18. Gráfica del contenido de ADN genómico y relación de absorbancias (A260/280 y A260/230) de <i>Festuca orthophylla</i> para cada uno de los tratamientos.	86
Figura 19. Gráfica del contenido de ADN genómico y relación de absorbancias (A260/280 y A260/230) de <i>Calamagrostis vicunarum</i> para cada uno de los tratamientos.	87
Figura 20. Gráfica del contenido de ADN genómico y relación de absorbancias (A260/280 y A260/230) de <i>Poa candamoana</i> para cada uno de los tratamientos.	88
Figura 21. Gráfica del contenido de ADN genómico y relación de absorbancias (A260/280 y A260/230) de <i>Bromus sp</i> para cada uno de los tratamientos.	89
Figura 22. Placa del gel de agarosa 1.....	90
Figura 23. Placa del gel de agarosa 2.....	90
Figura 24. Placa del gel de agarosa 3.....	91
Figura 25. Placa del gel de agarosa 4.....	91
Figura 26. E-Gel™ PowerBase™, para la técnica de electroforesis.....	92
Figura 27. A. <i>Bromus sp</i> , B. <i>Paspalum pygmaeum</i> , C sp. D. <i>Muhlenbergia peruviana</i>	106
Figura 28. A. <i>Bromus sp</i> , B. <i>Trifolium amabile</i> , C. identificación de muestras.....	107
Figura 29. <i>Margyricarpus pinnatus</i>	109
Figura 30. <i>Alchemilla pinnata</i> Ruiz y Pavón. sillo sillo.....	109
Figura 31. <i>Trifolium amabile</i> H.B.K. A, planta; B, flor; e, cáliz; D, E, F, estandartes.....	110

Figura 32. <i>Muhlenbergia fastigiata</i> (Presl). A, Planta; B, espiguilla.....	110
Figura 33. <i>Muhlenbergia peruviana</i> (Beauv). A, planta; B, espiguilla; C, glumas externas; D, gluma interna.....	111
Figura 34. <i>Paspalum pigmaeum</i> Rack. A, Planta; B, flósculo	111
Figura 35. <i>Festuca dolichophylla</i> Presl. chilligua A, raíz; B, glumas; C, espiguilla; D, inflorescencia. <i>Festuca orthopnylla</i> Pilger. Planta iru ichu E, espiguilla; F, raíz; G, panoja.	112
Figura 36. <i>Poa candamoana</i> Pilger. A, planta; espi- guilla; C, palea; 1), glu- ma inferior; E, lemma; F, gluma superior; G, pistilo	112
Figura 37. <i>Calamagrostis vicunarum</i> (Wedd) Pilger. "crespillo", "ñapapasto ": A. planta; B, glumas y flósculo.	113
Figura 38. <i>Bromus sp.</i> "cebadilla" A, planta; B, lemma; C, panoja; D, glumas.....	113
Figura 39. Flujograma de trabajo.....	114

RESUMEN

“EVALUACIÓN DE TRES PROTOCOLOS DE EXTRACCIÓN DE ADN TOTAL EN ESPECIES VEGETALES DE LA COMUNIDAD VEGETAL TIPO TOLAR DEL FUNDO QENA, DISTRITO CALLALLI – AREQUIPA” tuvo como objetivo evaluar tres protocolos de extracción de ADN de trece especies vegetales de la Comunidad Vegetal Tolar, el cual se realizó en el Laboratorio de Cambio Climático, Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad San Antonio Abad del Cusco. Los protocolos evaluados fueron: P1 (kit de extracción de ADN PureLink), P2 (kit de extracción de ADN más lisador celular, 1 ciclo, 110 segundos), P3 (kit de extracción de ADN más lisador celular, 4 ciclos, 60 segundos), comparándose los rendimientos del ADN en cantidad y calidad, medidos por espectrofotometría y fluorometría, y su integridad, medido por electroforesis en gel de agarosa.

Dependiendo de la especie vegetal, se puede obtener un ADN integro con buenos rendimientos de cantidad y calidad usando los 3 protocolos. Los protocolos 2 y 3 resultaron superiores en las especies *Trifolium amabile*, *Poa candamoana* y *Paspalum pygmaeum*.

El trabajo sienta las bases para futuras investigaciones en genética poblacional y estudios a nivel molecular para especies de la comunidad tipo tolar, pudiendo servir de referencia para otras especies vegetales altoandinas que presenten altos contenidos de metabolitos secundarios.

SUMMARY

“EVALUATION OF THREE PROTOCOLS OF EXTRACTION OF TOTAL DNA IN VEGETABLE SPECIES OF THE VEGETABLE COMMUNITY TYPE TOLAR OF THE FENA QENA, CALLALLI DISTRICT - AREQUIPA” had the objective of evaluating three DNA extraction protocols of thirteen plant species of the Tolar Plant Community, which It was carried out in the Laboratory of Climate Change, Faculty of Agricultural Sciences of the San Antonio Abad University of Cusco. The protocols evaluated were: P1 (PureLink DNA extraction kit), P2 (DNA extraction kit plus cell lyser, 1 cycle, 110 seconds), P3 (DNA extraction kit plus cell lyser, 4 cycles, 60 seconds) , comparing the yields of DNA in quantity and quality, measured by spectrophotometry and fluorometry, and its integrity, measured by agarose gel electrophoresis.

Depending on the plant species, an integral DNA with good yields of quantity and quality can be obtained using the 3 protocols. Protocols 2 and 3 were superior in the *Trifolium amabile*, *Poa candamoana* and *Paspalum pygmaeum* species.

The work lays the foundations for future research in population genetics and molecular level studies for species of the tolar type community, being able to serve as a reference for other high Andean plant species that have high secondary metabolite contents.

INTRODUCCION

En el Perú, existen aproximadamente 22 millones de hectáreas, de pastizales los cuales son importantes no solo por su valor como recurso forrajero para el pastoreo, sino también debido a los servicios ambientales que ofrecen (Flores, 2013). Sin embargo, más del 60 % de los pastizales altoandinos se encuentran en proceso de degradación debido a la ausencia de políticas de conservación, inadecuado manejo y sobrepastoreo lo cual genera reducción en la productividad de los pastizales, pérdida de biodiversidad, (Flores, 1996). Sumando a esto, el marco actual del cambio climático que promueve la desertificación. Los pastizales se pueden diferenciar hasta cinco tipos, en base al color, altura, composición del conjunto de plantas o vegetación que los componen, dentro de ellos están los Tolares, que son las comunidades vegetales dominados por la *Parastrephia lepidophylla* y *Diplostephium tacurense*, arbustos de baja aceptabilidad, propios de ambientes secos, logrando alcanzar una altura de hasta 0.70 m. (Flores, 1991). Debido a la importancia de estas especies vegetales de la asociación Tolar es necesario la aplicación de técnicas moleculares por ser una alternativa para el desarrollo biotecnológico, los cuales empieza con la extracción de ADN, sin embargo, no existen protocolos de extracción de ADN estandarizados aplicables a las especies vegetales de esta asociación Tolar. Bajo este contexto, el propósito de este trabajo de investigación es evaluar en el laboratorio de pastos, tres protocolos para la extracción de ADN total en especies de la comunidad vegetal tolar, usando el kit comercial de extracción de ADN vegetal PureLink, así mismo evaluar su concentración y calidad, con el fin de obtener un ADN con las características necesarias para ser usados posteriormente en técnicas de biología molecular.

PROBLEMA OBJETO DE ESTUDIO

Los tolares al igual que el resto de las comunidades vegetales, tienen un gran valor en el área ganadera, biológica, económica y por el servicio ecosistémico que brindan (Alzérreca *et al.*, 2002). El mal manejo de estos recursos naturales, con malas prácticas como la sobreexplotación, sobrepastoreo, cambio climático y falta de políticas de conservación (Alzérreca *et al.*, 2002), genera que un porcentaje de especies vegetales asociadas a la comunidad vegetal tipo tolar se encuentren en un proceso de extinción. Con el fin de generar conocimiento que ayude a contribuir a la conservación de este importante recurso genético, es necesario desarrollar técnicas moleculares que permitan con mayor precisión el estudio de la diversidad genética, cuya aplicación inicia con la extracción y purificación del ADN, siendo la obtención de un ADN de buena calidad y en cantidad adecuada un aspecto fundamental para la realización de procedimientos moleculares. En la actualidad no se tiene estandarizado un protocolo para la extracción de ADN de especies vegetales de los tolares ni para pastos altoandinos en general, siendo desconocido las variaciones de cantidad y calidad de ADN extraído entre las especies vegetales de los tolares

OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

Objetivos Generales

Evaluar tres protocolos de extracción de ADN total en especies vegetales de la comunidad tolar del Fundo Qena y determinar su integridad.

Objetivos Específicos

- Evaluar la concentración y pureza de ADN obtenido con los protocolos de extracción de las especies vegetales de la comunidad vegetal tipo tolar a través de espectrofotometría y fluorometría.
- Determinar la integridad del ADN obtenido con la técnica de electroforesis en gel de agarosa.

JUSTIFICACIÓN

Los Tolares tienen una gran importancia económica, ecológica y en específico zootécnica, siendo base alimenticia de animales domésticos y silvestres. El mal manejo de estos recursos naturales genera que un porcentaje de especies vegetales se encuentren en proceso de extinción (Salvador, 2002).

Estandarizar un protocolo de extracción de ADN en especies vegetales de la comunidad tipo tolar es un aspecto fundamental para la realización de procedimientos moleculares que generen herramientas para la conservación de los recursos genéticos.

En el Perú no se estandarizó un protocolo para la extracción de ADN en especies vegetales de la comunidad vegetal tipo tolar, ni el uso de biotecnologías que generen la conservación de los recursos genéticos, esto hace relevante comenzar con la estandarización de un protocolo para la extracción de ADN vegetal.

CAPÍTULO I:

1.1 ANTECEDENTES

A lo largo del tiempo se han diseñado diferentes protocolos con la finalidad de obtener una cantidad y calidad de ADN adecuados, así como garantizar la eliminación de inhibidores que afectan un tratamiento diferente. Los métodos tradicionales, fueron desarrollados en los años 50 y a partir de los años 90 se introdujeron al mercado paquetes de kits comerciales (Alejos et al 2005).

El Centro Internacional de la Papa (1996) purificaron ADN genómico de papa, camote y algunos cultivos andinos, usando una adaptación del protocolo propuesto por Murray y Thompson (1980), a partir de 4g de tejido foliar fresco y liofilizado, como detergente usaron (CTAB), El ADN obtenido fue en promedio 100 ug de DNA genómico por gramo de tejido foliar fresco. El ADN genómico extraído con este protocolo fue usado en los ensayos de RFLP y AFLP.

Wang *et al.* (1996) purificaron ADN genómico de Vid usando el método propuesto por Chase y Hills (1991) y 0.5g de hojas secadas con sílica gel, usaron como detergente CTAB. EL ADN que obtuvieron fue de 20 a 300ug por gramo de tejido foliar seco. El ADN extraído fue de buena calidad Ya que lo usa en los ensayos de PCR y corte con enzimas de restricción.

Porebski *et al.* (1997) extrajeron ADN genómico de *Fragaria sp.* "fresa" usando la técnica del CTAB modificada, usando 0.5g de tejido foliar en nitrógeno líquido. EL ADN genómico que obtuvieron fue 20 a 84 ul por gramo de tejido foliar maduro. DNA extraído fue utilizado en pruebas de RAPD y PCR.

Ouenzar *et al.* (1998) purificaron ADN de *Phoenix dactylifera* L. "palmera dactil", usaron 200mg de tejido foliar fresco que fue triturado con un mortero, como detergente usaron SDS. EL ADN genómico que obtuvieron fue de 30-35ug por gramo de tejido foliar fresco, estos valores nos indican su buena calidad debido a su utilidad en los ensayos de RAPD-PCR.

Perminge *et al.* (1998) extrajeron DNA genómico de *Gossipy hirsutum*, usando 0.5 g de tejido foliar fresco que fue triturado en nitrógeno líquido, como detergente usaron CTAB, el ADN genómico que obtuvieron fue de 150 a 400ug por gramo de tejido foliar fresco, estos valores nos indican la buena calidad del DNA mediante ensayos de RAPD-PCR.

Cardoso *et al.* (2000) extrajeron ADN genómico de *Euterpe edulis*, usaron material foliar y trituraron 0.4g de tejido foliar en nitrógeno líquido, como detergente usaron bromuro de alquiltrimetil amonio (MATAB). El DNA obtenido fue de buena calidad debido que fue usado para análisis AFLP.

Zhang *et al.* (2000) extrajeron ADN genómico de *Gossipium spp*, usaron de 50 a 100mg de tejido foliar joven a -80°C y trituraron el tejido con un homogeneizador eléctrico, como detergente usaron CTAB. EL ADN genómico que obtuvieron fue de 60ug por 50-100gr de tejido foliar fresco y la calidad del DNA fue suficiente para el análisis con enzimas de restricción y PCR.

Braga *et al.* (2002) extrajeron ADN genómico e *Solanum sesúliflomm* D. "cocona", utilizaron 50mg de brotes foliares obtenidos de vitroplántulas, los brotes fueron triturados con un minipilón descartable de diseño casero, usaron el método propuesto por Milligan (1992), modificado por Angulo (1999), como detergente

usaron SDS. EL ADN genómico que obtuvieron fue en promedio de 2300 mg por 50 mg de brote foliar fresco, el cual pudo ser utilizado para análisis mediante RAPD-PCR.

Uadhyay *et al.* (2002) extrajeron ADN genómico de *Cocos nucífera*, usaron 5g de brotes foliares en nitrógeno líquido, como detergente usaron SDS.

EL ADN genómico que obtuvieron fue de 300ug por gramo de brote foliar buena calidad debido a su utilidad en los ensayos de RAPD.

Khan *et al.* (2004) purificaron ADN genómico de *Gossipium sp*, usaron 300mg de tejido foliar fresco a -70°C y trituraron el tejido con un rodillo manual basándose en la técnica del CTAB, el ADN genómico que obtuvieron fue de 700 a 800ug de DNA por gramo de tejido foliar fresco.

Puchooa *et al.* (2004) sintetizaron ADN genómico de *Victoria amazónica*, usando 1g de tejido foliar fresco el cual fue triturado en nitrógeno líquido, como detergente usaron CTAB, el ADN obtenido fue 387.01 ug gramo de tejido foliar fresco buena calidad mediante ensayos de corte con enzima de restricción y electroforesis HPLC (cromatografía líquida de alta eficacia).

Ahmad *et al.* (2005) extrajeron ADN genómico de tres especies de dicotiledóneas (*Whitania somnifera*, *Tinospora cordijblia G* , *Pueraria tuberosa*) y una monocotiledónea (*Asparagus racemosus*), usaron 500 mg de hojas jóvenes y adultas procedentes de la misma planta, las cuales trituraron en un mortero estéril usando SDS, la cantidad de ADN vario entre las hojas jóvenes (de 67 a 174ug/g) con respecto a las hojas adultas (de 33 a 96ug/g) con ratios de calidad

260/280nm de 1.6 a 1.9 DNA que obtuvieron era de buena calidad en ensayos de digestión con enzimas de restricción y de RAPD-PCR.

García N. (2010) extrajo ADN en pastizales altoandinos *Festuca dolichophylla*, *Poa perligulata*, *Muhlenbergia ligularis*, *Trifolium amabile* mediante el protocolo estandarizado para pastos a partir del método CTAB del CIP, modificado en el laboratorio de biología molecular del INIA, el ADN obtenido se usó en marcadores moleculares AFLP

Gonzales (2012) extrajo ADN genómico *Persea americana* 0.1 gr de hojas en mortero agregándole nitrógeno líquido, usaron el protocolo de extracción de ADN genómico a pequeña escala (CIP 1997, modificado), como detergente usaron CTAB. Las concentraciones fueron desde 3.00 a 31 ug por microlitro, la calidad del ADN estuvo entre un valor de 1.4 y 2.6 (A260/A280).

Tamboada (2013) extrajo ADN genómico *Oenothera rosea*, *Oenothera multicaulis* y *Oenothera tetráptera*, usando 150-300 mg de tejido vegetal y el un kit comercial y 3 técnicas diferentes, después de realizar los diferentes tratamientos para la extracción del ADN genómico de las tres especies evaluadas de *Oenothera*, se obtuvo que los tratamientos de la técnica de extracción 3. La calidad del ADN genómico obtenidos para las tres especies evaluadas de *Oenothera*, se observó que todos los tratamientos de la técnica de extracción 3 dieron resultados de amplificación óptimos.

Remón & Peña (2018) estudiaron la diversidad genética de papas nativas (*Solanum sp.*) Usando 200 mg de tejido fresco, con el método CTAB (CIP 1997) modificado, como detergente usaron CTAB. EL ADN genómico que

obtuvieron osciló entre 300 a 500 ng/ μ L por 200 mg de tejido vegetal, posteriormente se hicieron análisis de la diversidad genética por AFLP.

1.2 MARCO TEÓRICO

1.2.1 Pastizales

Un pastizal se define como un ecosistema capaz de producir biomasa utilizable directamente por herbívoros; este ecosistema complejo, integra los cuatro componentes fundamentales de la naturaleza, el suelo, el clima, las plantas y los animales, todos éstos están ordenados y conectados de manera que constituyen una unidad o un todo, (Gastó et al., 1990) en estos ecosistemas se forman "comunidades vegetales" donde distintas especies vegetales interactúan entre sí y con el ambiente. Esta interacción se refiere a competencias por espacio, luz, agua y nutrientes entre las plantas que componen un pastizal, ya sean de la misma especie o no. (De León, 2004). Estos pastizales ocupan algo más de la cuarta parte de la superficie emergida del planeta (Newman, 2000) y en el Perú, la superficie que ocupa los pastizales llega a cerca de 19.6 millones de Ha (15% de la superficie actual), distribuidas en la costa (18%), en la sierra (70,2%) y en la selva (5%) y constituyen el principal sustento de la población ganadera nacional: 97% ovinos, 70% vacunos, 80% equinos y el 100% de los camélidos (MINAG, 2006). Los pastizales altoandinos se encuentran sobre los 3800 a 4000 msnm. Y están compuestas por una vegetación baja, cuya época de crecimiento coincide con la estación de lluvias. La mayoría son gramíneas perennes (Flores, 2005).

1.2.2 Clases de pastizales

Los pastizales pueden ser de tres clases: nativos (pradera nativa), cultivados (pasturas) y residentes. a) Pradera nativa está formada por "las tierras que producen forraje nativo para el consumo animal y que son revegetadas natural o artificialmente, para proveer una cubierta de forraje que se maneja como vegetación nativa". b) Pastura que son las tierras de pastoreo que están bajo un manejo relativamente intenso, usualmente con asociaciones de especies forrajeras exóticas y recibiendo prácticas culturales de preparación de suelos, fertilización, control de malezas e irrigación. c) Pastizales residentes. Son especies comunes a un área sin que se pueda distinguir si han sido nativas o introducidas, por ejemplo, el kikuyo en las laderas de los valles interandinos (Flores, 2005).

1.2.3 Sitios de pastizales

Príncipe (2008) dice que, sitio de pastizal es una clase distinta de pradera, que tiene cierto potencial para producir una comunidad vegetal, principalmente forrajera, es un área de pradera con una combinación de factores edáficos, climáticos, topográficos y bióticos naturales, significativamente diferente de otras áreas adyacentes. La clase y cantidad de especies forrajeras que crecen en un sitio son determinadas por la topografía, clima, exposición, nivel freático, profundidad del suelo, textura, precipitación y pH del suelo.

1.2.4 Formaciones vegetales de pastizales

Comunidad vegetal o formación vegetal: Son un grupo de plantas (hierbas o arbustos) con predominancia de una especie, que prospera en un determinado

hábitat y que es caracterizado por una serie de factores ecológicos (Flores, 2005). Los pastizales se pueden diferenciar hasta en 5 tipos en base al color, altura, composición florística, topografía, tipo de suelo y una serie de factores ecológicos (Flores, 1991; Yaranga, 2000; CONATURA, 2004), siendo estos:

Pajonales: Es el tipo de pastizal que ocupa la mayor extensión. Están agrupadas en matas de gramíneas de hojas duras, en algunos casos punzantes, que forman los pastizales, pudiendo encontrar especies predominantes como Iru ichu (*Festuca ortophylla*), Ichu (*Stipa ichu*), chiliwa (*Festuca dolichophylla*) y crespillo (*Calamagrotis sp.*)

Césped de puna: Este tipo de pastizal se caracteriza por la presencia de pastos almohadillados, arrosetados y de porte bajo, como el paqu paqu (*Aciachne pulvinata*), mula pilli (*Liabun ovatum*), pilli rosado (*Werneria nubigena*), checa checa (*Pycno phyllum*), pasto estrella (*Azorella diapsenoides*) y thurpa (*Nototrichelon girostris*).

Bofedales: Este pastizal se caracteriza por la presencia de especies vegetales de ambientes húmedos, de carácter permanente o temporales, semiacuáticas de porte almohadillado como la kunkuna (*Distichia muscoides*), libro libro (*Alchemilla diplophylla*), pilli (*Hipochoeris taraxacoides*) y puna pilli (*Werneria pigmaea*) y otras como Plantago, Oxiclee, etc.

Tolares: Son las comunidades vegetales predominadas por especies arbustivas adaptadas al clima seco como la panta tola (*Parastrephia lepidophylla*), manzana tola (*Diplostephium tacurense*) y chachacoma (*Baccharis microphylla*). Estas especies arbustivas están siendo deforestados

por el hombre y utilizados como fuente de energía en los hornos de panificación de la ciudad

Canllares: Formación vegetal conformado por especies vegetales de bajo valor forrajero, casi en su totalidad de rosáceas espinosas como cina canlli (*Margiricarpus pinnatus*) y orq'o canlli (*Margiricarpus strictus*).

1.2.5 Formaciones vegetal tipo tolar

Los tolares son comunidades de plantas compuestas por pastos, hierbas y principalmente de arbustos leñosos que crecen en los campos sin haber sido sembrados, están muy bien adaptados al medio y proporcionan forraje y protección al ganado doméstico y fauna silvestre. Ubicado entre 3000 a 4500 m.s.n.m. (Alzarreca et al., 2002). Las grandes formaciones de tolares se encuentran en la parte sur del país entre Arequipa, Puno y Cusco (Tovar, 1988) ubicadas en el flanco occidental del territorio peruano, esta zona es conocida como Puna Seca de la parte altoandina (Tovar, 1988). Los tolares se caracteriza por el predominio de comunidades vegetales arbustivas resinosa sobre las herbácea, como *Parastrephia lepidophylla* (“tola”), *Parastrephia phyllicaeformis*, *Baccharis tricuneata* (“tayanco”), *Diplostephyum* sp.; se incluyen otras arbustivas como, *Fabiana densa*, *Lupinus microphyllus*, *Chuquiraga espinosa*, *Senecios pinosus*, *Ephedra americana*; herbáceas como *Stipa inconspicua*, *Pycnophyllum molle*, *Festuca rigescens*, *Aciachne pulvinata*, *Calamagrostis vicunarum*, *Stipa ichu*, *Aciachne pulvinata*, *Werneria* sp., *Senecio spinosus* y *Calamagrostis vicunarum* (MINAG, 2015) ,

Parastrephia quadrangularis (Meyen) Cabrera (Martínez, 2002), *Baccharis microphylla* (Yaranga, 2000).

La mayoría de estas especies arbustivas son perennes y siempre verdes, reciben el nombre de “Tolas” ocupando una vasta extensión que se cubren de un sustrato herbáceo bajo en épocas de lluvias (Vargas y Jiménez, 1989).

1.2.6 Importancia de formaciones vegetal tipo tolar

Alzerreca *et al.* (2002) afirman que los tolares tienen una importancia económica y ecológica, como:

- La estructura de los tolares como comunidades vegetales posibilita a que estas actúen como eficientes cortinas rompe vientos.
- Los ecosistemas de tolares aportan protección a los animales domésticos y fauna silvestre.
- La vegetación de los tolares estabiliza y protege los suelos contra todo tipo de erosión.
- Entre las t'ulas, la sup'ut'ula, nakat'ula y lampaya t'ula forman parte de la dieta de llamas y ovejas, aunque estos porcentajes están por debajo del 4%.
- Los ecosistemas de tolares presentan microclimas benignos y suelos fértiles que benefician el crecimiento y producción de especies forrajeras para la alimentación del ganado y para agricultura en lugares con clima apropiado.
- Los usos de la tola en las culturas andinas fueron tradicionales y en el presente estos aún continúan.

- La tola cuya forma de planta de media luna investida o cono truncado hace que sirva como colchón de las gotas de lluvia, las cuales posibilitan mayor absorción de agua para el suelo.
- A la vez, indica que hay diferentes especies de tolas las cuales se caracterizan a una vegetación que se encuentran en zonas de altura, lo que constituye un aporte a la biodiversidad florística de arbustos en los Andes.

De la misma manera, Beck et al. (2010) identificaron nueve formas de uso de los tolares en el altiplano, entre ellas el uso alimenticio, ceremonial, combustible, construcción, cosmético, forrajero, medicinal, tintorero y como detergente. A su vez, el mismo autor indica que la tola sirve para la protección del suelo contra la erosión, albergue y alimento de enemigos naturales de plagas de cultivos, actividad simbiótica con micro organismos entre otros usos.

1.2.7 Especies vegetales colectadas de los tolares de Qena

1.2.7.1 *Parastrephia lepidophylla* “Tola”

Aspecto general

Es una planta arbustiva resinosa de olor característico, muy abundante en la zona de cordillera del Sur del Perú y con una gran importancia económica como fuente de leña para combustible y panadería, así como por sus propiedades cicatrizantes (Reynel, 1988). Además, se constituye como una de las especies dominantes de los tolares o arbustales del altiplano andino árido y semiárido, que son ecosistemas nativos para el pastoreo del ganado (Genin y Alzérreca, 2006). Su distribución comprende los andes del Perú (Lima, Ayacucho, Arequipa, Moquegua, Tacna, Cuzco, Puno), Bolivia, Chile y Argentina, en zonas

secas y rocosas con alturas entre los 3440 y 4500 m (Nesom, 1993). Esta planta, de acuerdo con su respuesta a la presión del pastoreo se clasifica como una especie decreciente (D), dentro de los ecosistemas de tolar, e invasora tipo 1 (I-1) en ecosistemas de pajonal en Puna seca (Flores y Oscanoa 1992). Este arbusto, resinoso, lignificado, erecto, ramoso; tiene una altura de 0,5 a 2,0 m, con una cobertura aérea de 197,1 cm² por planta y un área basal de 106,4 cm². **Tallo:** Primario no es notorio, sin embargo, los tallos secundarios son de forma cilíndrica, erectos, resinosos, lignificados; con un grosor promedio de 1,80 cm, glabros o ligeramente tomentosos. **Hojas:** Enteras y semi-agudas en el ápice y ensanchadas en la base, carnosas y adosadas al tallo con 0,20 cm de largo y 0,1cm de ancho. **Inflorescencia:** En capítulos y cabezuelas solitarias en los ápices de las ramitas. **Flores:** Dimorfas, las flores femeninas vienen a ser las que se encuentra en el perímetro del capítulo, que en su mayoría son en un número de 7 a 8 flores con 0,4 cm de altura (Paca et al. 2003).

1.2.7.2 *Baccharis microphylla* (Kunt.) Sinom. “Thola macho, Orkothola”
Aspecto general.

Arbusto de 1.20m, muy ramificado y lignificado desde la base, apretado de follaje en las partes terminales. Hojas: Pequeñas, coriáceas y muchas veces con tres dientes menudos. Inflorescencia: Capítulos numerosos, solitarios en las axilas de las hojas y en el extremo de las ramillas. Flores: En cabezuelas blanquecinas y pequeñas de hojas sésiles, oblongo-espátulada 0.6 a 1.2 cm de largo por 0.2– 0.5 cm de ancho, enteras o frecuentemente con 1 a 2 dientes de cada lado (Tovar, 1989). La *Baccharis microphylla* es clasificada

como una planta no deseable para la alimentación animal (Tapia y Flores 1984), pero es usada en la alimentación humana, ya que sus los abultamientos en las ramas (agallas, a veces llamado “frutos”) sirven como sustituto del limón. Y también es usado para leña. Cumplen funciones importantes en el balance hídrico de las cuencas y Constituyen hábitat para especies de fauna silvestre de la puna y Sostén alimenticio de ganado camélido y ovino. (Villapando et al., 2011) Se demostró en experimento in vitro que la *Baccharis microphylla* tiene una buena actividad antimicrobial, esto representa un gran potencial para la etnomedicina (morales et al., 2008).

1.2.7.3 *Margiricarpus strictus* “Orqo kanlli, llanta kanlli”

Aspecto general

Arbusto pequeño de 20-40 cm. de alto, que se desarrolla especialmente en campos sobre pastoreados y que por sus espinas puede causar daño al ganado. **Hojas:** Simples, fasciculadas. **Flores:** Pequeñas flores hermafroditas solitarias. **Fruto:** Drupa de ángulos alados. (Hitchcock 1927).

Margiricarpus strictus es una especie espinosa y bastante lignificada que es una planta indicadora de suelos, que se desarrolla en suelos alcalinos, clasificada dentro de las especies indeseables para la alimentación animal (Tapia y Flores, 1984), estas especies arbustivas de bajo valor nutritivo cumplen la función de proteger el suelo de la erosión (CONATURA, 2004)

1.2.7.4 *Margyricarpus pinnatus* “China kanlli, kanlli”

Aspecto general

Arbusto pequeño de 20-40 cm. de alto, que se desarrolla especialmente en campos sobre pastoreados y que por sus espinas puede causar daños al ganado. Hojas: Pinnadas, las hojuelas apenas setosas en el ápice. Flores: Pequeñas flores hermafroditas solitarias. Frutos: Drupa con ángulos nervados (Hitchcock 192). Este arbusto es considerado indeseables para el pastoreo, y son indicadores de suelos pobres (Tapia y Flores, 1984) y cumplen la función de proteger el suelo de la erosión (CONATURA, 2004).

1.2.7.5 *Alchemilla pinnata* Ruiz et Pavón “Sillosillo”

Aspecto general

Planta perenne rastrera, enraizada en los nudos del tallo. **Hojas:** Comúnmente algo plateadas, villosas, de 3-6 cm de largo pinnadas. **Flores:** Solitarias, pequeñas, amarillentas, pediceladas, villosas o glabras, variable en pubescencia, lóbulos de cáliz subiguales (Tovar, 1989). Es una planta pequeña, perenne, de porte postrado, que tiene ramas muy pilosas de un color verde plateado; las hojas son bipinnadas y las flores de color amarillo verdoso son generalmente solitarias. La producción de estolones le permite propagarse fácilmente. Se desarrolla en sitios húmedos o debajo de especies mayores como la chilliwa, donde aprovecha la humedad y sombra que le da esta especie. Este pasto es uno de los más apetecidos por el ganado ovino y alpacuno en especial. Se han efectuado trabajos sobre la ecología y análisis químico de esta rosácea alto-andina, encontrando un alto valor en minerales, sobre todo calcio y fósforo (Tapia y Flores, 1984). Debido a su crecimiento activo en condiciones de frío y semi aridez, y a su elevada palatabilidad, representa una alternativa

forrajera para cubrir suelos degradados (Halloy, 1995), jugando un papel fundamental en la protección del suelo (Ragone, 1967), y en el área de nacientes de cuencas (Quiroga, 2001).

1.2.7.6 *Trifolium amabile* Humb. Bonp. Et Kuth “Layo”

Aspecto general

Planta cespitosa de raíz pivotante, engrosada y muy desarrollada de hasta 25 cm de largo. Tallo: Poco elevado de la superficie del suelo. Hojas: Trifoliadas, los foliolos anchamente aovados. Inflorescencia: Cabezuelas cortamente pedunculadas. Flores: De 8 – 14, de 5 – 7 mm de largo con brácteas subuladas en la base; corola blanquecina o rosada, ovario con 2 óvulos; fruto legumbre corto con 1 ó 2 semillas. Suelos semi húmedos de preferencia, en la región altoandina. Muy palatable en alpacas y ovinos, es una excelente leguminosa que se constituye en uno de los principales recursos proteicos de los pastizales altoandinos (Tovar, 1989).

Esta leguminosa tiene una frecuencia menor del 8% en los pastizales y aunque es un porcentaje relativamente bajo presenta una relación de asociación con otras especies de la comunidad vegetal, revelando que esta leguminosa está asociado positivamente a gramíneas de porte alto como *Festuca dolichophylla* y de porte bajo como *Muhlebergia fastigiata*, dos especies forrajeras importantes en la alimentación del ganado (Argote et al., 2013), considerada una planta importante para mejorar la calidad de forraje cuya presencia ha sido reportada desde 2000 a más de 4000 msnm (De la Cruz, 2007) siendo una de las pocas especies forrajeras de la familia fabaceae que se halla distribuida en

las praderas alto andinas (Chaquilla, 1969). Esta leguminosa es resistente a la sequía, tolerante a bajas temperaturas y, por su excelente valor forrajero (Tapia y Flores, 1984) podría ser aprovechada en beneficio de una mejor producción ganadera y por su grado de adaptación a condiciones de puna, donde muchas otras leguminosas exóticas tienen pocas posibilidades de prosperar (Argote et al., 2013).

1.2.7.7 *Muhlebergia fastigiata* “Grama blanca, Llachu, chili”
Aspecto general

Es una planta perenne, larga rastrera. Hojas: De 1-2 cm de largo, planas, suaves. Flores: Panículas pequeñas con espiguillas unifloras. Presente en suelos sueltos, descubiertos, algo húmedos, se desarrollan entre los 3800 y 4400 metros de altitud. (Tovar, 1989). Esta gramínea se considera deseable para el pastoreo y las partes vegetativas de esta planta pueden formar algunas especializaciones, como los tallos que pueden ser subterráneos o rizomas y que en algunos casos dan origen a brotes que forman nuevas plantas (Tapia y Flores, 1984).

El césped tupido de *Muhlebergia fastigiata* se debe a los numerosos y fuertes rizomas de este pasto, que logran atravesar muchas veces la raíz engrosada de otras especies como *Trifolium amabile*. (Tapia y Flores, 1984)

1.2.7.8 *Muhlebergia peruviana* “Llapa pasto, Coja ñapa, ñapa, ñapa pasto”
Aspecto general

Planta anual delicada, de 3 – 15 cm de altura, de caña filiforme. Hojas: Tamaño de 1 – 3 cm de largo, comúnmente planas y suaves. Inflorescencia: En

panículas angostas, algo sueltas, de 1 – 4 cm de largo; espiguillas uniflores, con glumas desiguales, siendo la superior tridentado; lenma con arista apical larga y delgada (Tovar, 1989). Esta gramínea anual de porte muy pequeño clasificada dentro de las especies poco deseadas para el pastoreo (Tapia y Flores, 1984), tiene un papel importante en la colonización de discontinuidades o “claros” de la cobertura vegetal producida por los herbívoros, cumpliendo la función de protección de suelo (Grime, 1998).

1.2.7.9 *Paspalum pygmaeum* “Sara sara”

Aspecto general

Planta enana, anual, de hasta 8 cm de altura, algo postrada. Hojas: De 1 – 1.6 cm de largo, algo planas. Inflorescencia: En panícula pequeña con 3 a 5 racimos de 8 – 10 mm de largo, generalmente igualado o excedido por las hojas superiores; espiguilla convexa, de 1.5 – 1.7 mm de largo (Tovar, 1989). Esta pequeña gramínea anual de gran palatabilidad crece bien en pastizales abiertos, desapareciendo con las primeras heladas. Es una especie muy apetecida por el ganado, por la suavidad de sus hojas. Sin embargo, su tamaño pequeño hace que su producción sea muy baja (Tapia y Flores, 1984).

1.2.7.10 *Festuca orthophylla* Pilg. “Hiru Ichu, Paja brava”

Aspecto General

Alcanza 20 a 50 cm de alto y forma macollos. Hojas: Delgadas pardo plumizas, con bordes ásperos, erectas, aciculadas, de 5 a 13 cm de largo y 1 a 2 mm de ancho. Inflorescencia: Es una panícula lineal; de 4,5–6 cm de largo y 6–8mm

de ancho. Flores: Espiguillas rectas, que aparecen a finales de la primavera y a principios del verano (Costas, 1979).

La *Festuca orthophylla* se reconoce fácilmente, pues al madurar se lignifica y endurece como la chilliwa de manera que las hojas son punzantes y se convierten en verdaderas lanzas que dañan el hocico de los animales, esta gramínea forma matas distanciadas entre sí dejando amplias zonas desnudas. Esta vegetación se desarrolla en suelos arenosos a las orillas de los ríos en el altiplano y en planicies sobre los 4,000 m. Debido a la baja cobertura que ofrece, la biomasa producida también es menor que en los otros pastizales y el pasto producido anualmente, escasamente alimentaría 0.6 U.O. Ha/año, entrando en la categoría de plantas poco deseables para el pastoreo. (Tapia y Flores, 1984).

1.2.7.11 *Calamagrostis vicunaru* (Wedd) Pilger "Crespillo, Ñapa-pasto"

Aspecto general

Especie perenne, cespitosa, de 10-30 cm. Hojas: Ligeramente planas, Inflorescencia: Numerosas inflorescencias, láminas filiformes, involutas, flexuosas y a menudo, rizadas "escabrosas", principalmente en la base. Flores: Panículas duras de 2-6 cm de largo; las espiguillas son unifloras, de 5 mm, sostenidas por raquillas escasamente pubescentes, tiesas y desarticuladas (Tovar, 1989).

Es una especie muy rústica, que se desarrolla en suelos pobres, franco-limosos, de buen drenaje, resistiendo bien a la sequía y las heladas., Cuando es tierno es apetecido por el ganado, perdiendo su calidad cuando madura, sobre todo las panículas que no son apetecidas, juntos con otras gramíneas como *Stipa ichu*, *Festuca dolichophylla*, *Festuca orthophylla*, forman matas compactas que resisten el viento y frío, permitiendo el crecimiento de otras especies menores en su base o constituyendo un microclima formado por su parte aérea. (Tapia y Flores, 1984).

1.2.7.12 *Poa candamoana* Pilger "Cebadilla"; K'acho

Aspecto general

Planta perenne, de 10 – 30 cm de altura. Hojas: Mayormente basales de 5 – 15 cm de largo, involutas, excepto la más superior plana. Inflorescencia: Panícula de 4 – 8 cm de largo, abierta, con ramas ascendentes o divergentes; espiguillas algo aglomeradas, 2 – 3 floras, de 4 – 4.5 mm de largo, lemma de 3.5 – 4 mm de largo, pubescente hacia la base. (Tovar, 1989).

Esta *Poa* está también presente en estos suelos húmedos. Además, su presencia en pastizales secos es un índice de adecuado pastoreo, ya que en zonas sobre pastoreadas su existencia es casi nula siendo una especie deseable (Tapia y Flores, 1984).

1.2.7.13 *Bromus* sp "Cebadilla"

Aspecto general

Son plantas erectas, ligeramente postradas, bianuales o perennes de vida corta, según se desarrollan en suelos ricos o de baja fertilidad, las especies de

los Andes poseen aristas más largas (1-5 mm). Hojas: Con vaina cerrada, lígula membranosa y láminas planas o plegadas Inflorescencia: Las espiguillas' son de 6-12 mm, flosculadas. Flores: Panícula abierta de hasta 25 cm. Fruto: Las vainas varían desde glabras hasta pilosas, la lígula es oblonga, obtusa, hialina hasta de 5 mm. Láminas planas, algo laxas de largo. (Hitchcock, 1927).

Esta especie es regularmente apetecida por el ganado, sobre todo en estado tierno, esta planta es rica en proteínas, calcio y fósforo, prefiere suelos húmedos y se encuentran en terrenos cultivados (Luces, 1958).

1.2.8 Degradación de pastizales

La degradación de pastizales en general se describe como la pérdida de la productividad biológica y económica, durante un periodo de tiempo, esto vinculado a la actividad humana y el uso no sostenible del suelo, generando un impacto sobre la composición de la vegetación, función hidrológica y procesos del suelo (Bedunah y Angerer, 2012), lo que conlleva a la pérdida de capacidad de producción de forraje tanto para la fauna nativa como para el ganado, siendo los principales efectos en la reducción de servicios ecosistémicos que incluyen: (1) biodiversidad, que disminuyen en términos numéricos, variedad y rango; (2) protección de cuencas; (3) reserva de carbono; y (4) calidad del aire. (Brown et al., 2008). Esto produce que un porcentaje de especies vegetales de importancia ganadera estén en proceso de extinción, debido a la degradación de pastizales a causa de la sobrecarga animal. El pasto no cumple su ciclo biológico y no llega a la floración sin poder regenerarse por sí sola (Salvador, 2002),

1.2.9 Causas de la degradación de pastizales

Factores tanto naturales y antrópicos, son la causa de la degradación de pastizales, como el uso inapropiado de la tierra y de las políticas de estado, inadecuada supervisión de la gestión de los pastizales, pobreza y baja rentabilidad de los sistemas de producción ganadera y sobreutilización de estos. Los factores inducidos por la actividad humana se ven agravados por: (1) la pobre comprensión del funcionamiento global y la resiliencia de ecosistemas; y (2) deficiencia de políticas gubernamentales a mediano y largo plazo de los impactos ambientales generados por intervenciones en planificación o ejecución.; (Flores, 2004; Brown et al., 2008) La degradación del ecosistema andino es un problema complejo que está relacionado con el modelo de organización al interior de las comunidades, a la política de tenencia de la tierra y al gobierno; se ha observado que las peores condiciones ecológicas corresponden a los niveles más elementales de organización y a economías de subsistencia; el sobrepastoreo, las prácticas de manejo inadecuadas, la sobreexplotación de los recursos y la falta de prácticas de conservación se encuentran entre las causas principales de la degradación del suelo en los pastizales andinos (Recharte et al, 2009).

1.2.10 El uso de la biotecnología para la conservación de la biodiversidad.

Existe un porcentaje de especies vegetales de importancia ganadera se encuentra en proceso de extinción por la vulnerabilidad a causa de sobrecarga animal. El pasto de buena calidad agrostológica no cumple su ciclo biológico, es decir no llega a la floración y poder regenerarse por sí sola (Salvador,

2002), bajo este contexto es importante generar herramientas que promuevan la conservación de estas especies vegetales, y con el fin de contribuir a la conservación de los recursos genético, es necesario desarrollar protocolos moleculares que permitan determinar los niveles de variación genética dentro de las poblaciones en diferentes condiciones ambientales, (González-Astorga et al., 2006) ya que La variación genética determina la forma en que una especie interactúa con su ambiente y con otras especies. Toda esta diversidad genética surge en el ámbito molecular y esta íntimamente ligada con las características fisicoquímicas de los ácidos nucleicos. A este nivel, la biodiversidad surge a partir de mutaciones en el ácido desoxirribonucleico (ADN) (Moreno, 2001), entonces el estado actual del conocimiento, contar con una técnica efectiva para el proceso de extracción de ADN es un paso crítico en todos los estudios de genética molecular (Boiteux et al., 1999). Contar con protocolos rápidos, óptimos y confiables para la extracción de ADN resulta siempre deseable para aplicar todo tipo de biotecnología.

1.2.11 EL ácido desoxirribonucleico (ADN)

El ADN (ácido desoxirribonucleico) es una molécula orgánica identificada como la molécula autorreplicable, el vehículo de la información requerida para la síntesis de las proteínas (Ruiz de Castilla, 2004).

El descubrimiento de que las grandes moléculas de ADN llevan información genética, representa uno de los triunfos científicos del siglo pasado. El ADN ha sido identificado como la molécula autorreplicable, el vehículo de la información requerida para la síntesis de las proteínas que llevan el modelo

de la materia viva de una generación a la próxima. Ellos dirigen la elaboración de enzimas que forman parte en todas las reacciones químicas de la vida (Ruiz de Castilla 2004), esto representa para la biología uno de sus aportes más importantes, reconociendo el ADN como “la molécula de la vida”, el estudio de sus propiedades fisicoquímicas y biológicas ha desarrollado, en menos de 50 años, un enfoque totalmente nuevo en lo que refiere al origen, flujo y almacenamiento de la información genética en todo ser vivo (Rocha, 2002).

1.2.11.1 Estructura del ADN

Esta macromolécula en forma de hilo está constituida por dos cadenas de nucleótidos unidas entre sí, formando una doble hélice. Los nucleótidos están integrados por un azúcar (desoxirribosa), un grupo fosfato y una base nitrogenada (adenina, guanina, timina o citosina). La unión de los nucleótidos ocurre entre el grupo fosfato y el azúcar, mediante enlaces fosfodiéster, dando lugar al esqueleto de la molécula. Las bases de cadenas opuestas se unen mediante puentes de hidrógeno y mantienen estable la estructura helicoidal (Alejos et al, 2015)

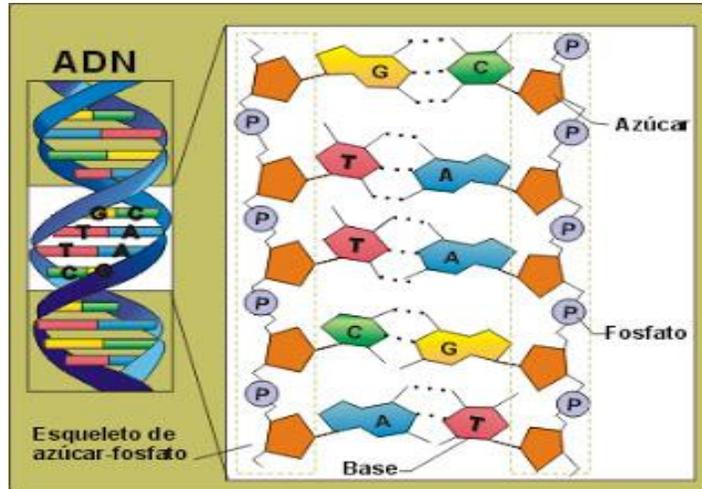


Figura 1. Estructura del ADN

1.2.12 Importancia de la extracción de ADN

En la actualidad, el estudio de la variación genética entre individuos, poblaciones y especies para explicar patrones y procesos ecológico-evolutivos se aborda mediante marcadores moleculares, segmentos de ADN con o sin función conocida que proporcionan información sobre la variación alélica y permiten distinguir individuos. Estos marcadores se obtienen con técnicas como la PCR y secuenciación, que hacen posible analizar la variación en la molécula del ADN con un detalle sin precedentes. Los datos moleculares han permitido estudiar con mayor precisión los patrones de diversidad genética y su distribución; el comportamiento; la selección natural; las interacciones biológicas; la composición, funcionamiento y dinámica de comunidades microbianas; las relaciones filogenéticas, entre otros (Schlötterer, 2004), la aplicación de estas herramientas moleculares inicia con la extracción de ADN y la obtención exitosa de datos confiables y reproducibles depende, en gran medida, de la extracción de un ADN íntegro

y puro. La extracción consiste en el aislamiento y purificación de moléculas de ADN y se basa en las características fisicoquímicas de la molécula (Alejos et al, 2015), este proceso implica romper o digerir las paredes celulares para liberar los constituyentes celulares. A esto le sigue la lisis de las membranas celulares para liberar el ADN para su posterior amplificación. Los problemas encontrados en la extracción y purificación de ADN de alto peso molecular en ciertas especies vegetales conllevan la presencia de diferentes contaminantes. Entre ellos, los polisacáridos se encuentran entre los contaminantes más difíciles de separar del ADN (Murray & Thompson, 1980).

Métodos tradicionales fueron desarrollados desde los años 50 para la extracción de ADN, con la finalidad de obtener la cantidad y calidad adecuados, así como garantizar la eliminación de inhibidores potenciales que dificulten el tratamiento posterior de la molécula. En general, estos protocolos tradicionales consisten de cinco etapas principales: homogeneización del tejido, lisis celular, separación de proteínas y lípidos, precipitación y redisolución del ADN (Alejos et al, 2015).

1.2.13 Proceso de extracción de ADN

1.2.13.1 Recolección del material genético

Una de las importancias en cualquier procedimiento de extracción de ADN de plantas es la manera utilizada para coleccionar y preservar el tejido vegetal, ya que la condición fisiológica en especial, y no tanto el protocolo que se va utilizar determina la calidad del ADN. En la colecta se deben cumplir con algunas condiciones (CIP, 1998). Se recomienda coleccionar tejido joven pues

contiene más células por unidad de peso que el tejido viejo y posee menos polisacáridos y poli fenoles que dificultan la extracción. Una vez colectado, el tejido debe congelarse inmediatamente en nitrógeno líquido para evitar la formación de cristales y que se sinteticen metabolitos secundarios después de la abscisión. Una vez colectada el material fresco puede ser colectado y mantenido en hielo o en un frigorífico durante algunos días hasta ser procesado. Si fuera necesario un almacenamiento prologando, el material puede ser congelado a -20°C durante algunas semanas, o -80°C indefinidamente y descongelado justo antes de la extracción (Ferreira et al., 1998), evitando de este modo la descomposición de las muestras, ya que la congelación de los tejidos es una manera rápida de endurecerlos sin necesidad de inclusión, por lo que la preservación molecular es máxima (Morris et al., 2003). Alternativamente, el tejido puede ser liofilizado y almacenado a temperatura ambiente entre 15 y 25 $^{\circ}\text{C}$, aunque esta alternativa no es viable para suculentas. (Alejos et al., 2005)

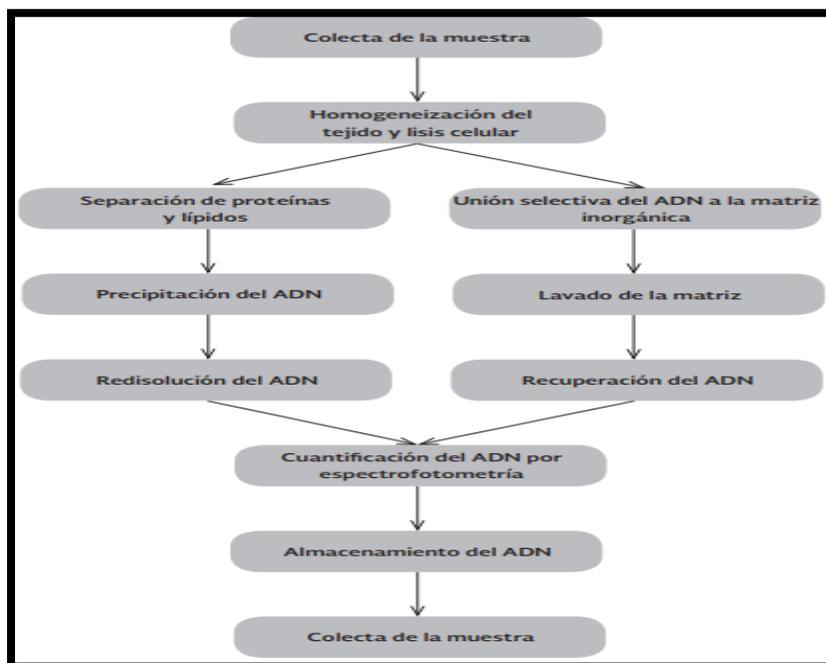


Figura 2. Etapas de la técnica

1.2.13.2 Homogeneización del tejido

La homogeneización, consiste en romper las uniones entre las células para facilitar la interacción con las soluciones de lisis que ayudan a liberar el material genético, la homogeneización puede ser mecánica o química (Alejos et al., 2005) y entre los principales métodos tenemos

Homogeneización mecánica

(1) Nitrógeno líquido, Este procedimiento consiste en macerar la muestra con nitrógeno líquido, en un mortero de porcelana, hasta obtener un polvo muy fino. El nitrógeno líquido, congela de inmediato la muestra y evita que se formen cristales en el interior de la célula que rompen la estructura celular e inicie el proceso de degradación. (Alejos et al., 2005).

(2) Pistilos u homogeneizadores, Los pistilos disgregan la muestra mediante fricción con la pared del tubo que contiene la muestra, adicionalmente se puede utilizar algún material abrasivo como vidrio pulverizado o resinas. (Alejos et al., 2005).

(3) Homogenización por Beadruptor 12, Es un homogeneizador de perlas más poderosas y económicas disponibles en la actualidad, ideales para una variedad de aplicaciones que requieren moliendas, lisis y homogenización de muestras biológicas antes de la extracción molecular donde puedes varias velocidades y ciclos para obtener mejores rendimientos.



Figura 3. BeadRuptor 12.

HOMOGENIZACION QUIMICA

En esta homogenización la muestra se mantiene en solución a altas temperaturas en presencia de detergentes, proteasas y agentes caotrópicos que rompen las uniones entre las células o que incluso pueden perforar la membrana celular. La disgregación química es recomendable para bacterias, muestras pequeñas de tejidos frescos o sangre (Alejos et al, 2005).

1.2.13.3 *Lisis de la membrana celular*

El paso de disrupción de la pared celular, membranas de organelos, y la liberación del ADN de la célula. Este puede ser logrado por tratamientos químicos (usualmente detergentes), mecánicos, enzimáticos, de microondas, de sonicación, calentamiento o enfriamiento, (Keer et al., 2008). Existen diferentes tipos de detergentes (Tabla 1) que actúan de denaturante resultando adecuado para la lisis celular (Alejos et al., 2005). Los detergentes más utilizados son el bromuro de cetil trimetil amonio (CTAB), lauril sulfato de sodio (SDS). Muchas soluciones de lisis contienen también EDTA, que forma un complejo con los iones de Mg^{2+} e impide el funcionamiento de las DNAsas (Sambrook et al., 1989).

METODO CTAB. detergente catiónico CTAB ayuda a la lisis de la membrana celular y se une fuertemente al ADN formando un complejo, desplazando a las proteínas, lo que evita así su degradación (Valadez, 2000), debido a que este detergente interfiere con el uso posterior del ADN en el estudio de marcadores moleculares, es necesaria su eliminación; el CTAB, las proteínas y los restos celulares, se eliminan en una interfase con extracciones con solventes orgánicos y el material genético permanece en fase acuosa y listo para su precipitación (Rogers, 1994).

MÉTODO SDS, el detergente aniónico SDS solubiliza todos los componentes celulares manteniendo el ADN en solución. Los protocolos que utilizan SDS son muy parecidos a los de CTAB. La principal diferencia es que la separación de la fase orgánica y la precipitación del ADN se llevan a

cabo aumentando la concentración de sales. Existen paquetes comerciales para la extracción de ADN en diferentes tipos de material que utilizan el detergente SDS (Dellaporta hoet al., 1983; Kim et al., 1997). Tanto la Homogenización como la lisis celular son similares en los protocolos tradicionales y comerciales. (Alejos et al., 2015)

Tabla 1. Detergentes y denaturadores comunes usados en la extracción de ADN.

DETERGENTE DENATURADOR	DESCRIPCIÓN	CONCENTRACIÓN FINAL
CTAB	Detergente catiónico que solubiliza la membrana y forma un complejo con el ADN permitiendo la selectiva precipitación por concentraciones bajas de sales, <0.5 M. o adicionando isopropanol. Puede ser usado para plantas y matrices con alta cantidad de polisacáridos.	1-2% (Vol/Vol) (puede precipitar a temperaturas menores a 15°C)
Isotiocianato de guanidina	Es un agente chaotropico o denaturante de proteínas el cual es usado a altas concentraciones de sales, inhibe nucleasas.	4-5-M
Fenol	Denaturante de proteínas. Se añade AL extracto de ADN, colectando las proteínas en una fase orgánica, el ADN se mantiene en la fase acuosa.	4-5-M
Sarkosyl	Detergente aniónico usado en lugar del SDS debido a que el altamente soluble (el SDS es insoluble in altas concentraciones de sales)	0.5-2.0% (vol/vol)
SDS	El SDS (<i>Sodium dodecyl sulfate</i>) es un detergente anionico y denaturante proteico. Desasocia complejos ADN – Proteína. Forma espuma cuando se agita.	0.5% (vol/vol)
Triton-X	Detergente no iónico que solubiliza proteínas sin desnaturalizarlas.	
Tween	Detergente no iónico que solubiliza proteínas sin desnaturalizarlas.	0.5% (vol/vol)

Fuente: Keer, et al. (2008).

1.2.14 Protocolo tradicional

1.2.14.1 *Separación de proteínas y lípidos*

En esta etapa se separa el ADN de las proteínas y lípidos mediante solventes orgánicos y ciclos de centrifugación. Se utiliza la fuerte tendencia hidrofílica de los grupos fosfato para separarlos en medios acuosos, mientras que las proteínas y los lípidos se separan en solventes orgánicos (Sambrook et al., 1989). La fase acuosa y la orgánica se separan por centrifugación lo que permite aislar al ADN. Los solventes que se usan frecuentemente son el fenol, el cloroformo y el alcohol isoamílico (Stulnig y Amberger, 1994).

1.2.14.2 *Precipitación del ADN*

Después de que son eliminados los lípidos y las proteínas, se recupera el ADN. Para ello, se adiciona etanol y soluciones con altas concentraciones de iones de sodio o amonio que se unen a los grupos fosfato, esta mezcla reduce las fuerzas repulsivas entre las cadenas y permite que el ADN se pliegue sobre sí mismo haciéndolo insoluble. Un paso de centrifugación permite que el ADN permanezca en el fondo del tubo mientras que el etanol es desechado. Los restos de etanol se eliminan con un lavado con etanol al 70% y el remanente se elimina por evaporación (Alejos et al, 2005).

1.2.14.3 *Redisolución del ADN*

Una vez que se ha eliminado el etanol, el paso siguiente es hidratar el ADN para mantenerlo en solución. En el caso de emplear agua, el pH debe ser de 7 para permitir la redisolución completa del ADN y evitar una hidrólisis ácida.

Cuando se está disolviendo el ADN es importante evitar el pipeteo y la agitación agresiva pues se pueden fragmentar moléculas de alto peso molecular. Una opción que evita la fragmentación consiste en incubar a 55 °C el ADN, 1 a 2 horas con agitación suave (Alejos et al, 2005).

1.2.15 Protocolo comercial

A inicios de los años 90 entraron al mercado kits de extracción que utilizan matrices inorgánicas compactas cargadas positivamente capaces de retener varios microgramos de ADN y separarlos del resto de las biomoléculas, permitiendo obtener un extracto libre de inhibidores. Los combos se venden en presentación de membranas de sílice o perlas magnéticas, las primeras están formadas por una resina y las segundas consisten de un centro de hierro recubierto por resina. Hoy en día hay diferentes empresas que formulan kits comerciales de extracción de ADN, los cuales en la mayoría de los casos suelen ser óptimos para la extracción de material genético y rápido, pero de un costo elevado (Dundass et al., 2008).

1.2.16 Protocolo comercial Purelink

El kit de purificación de ADN de plantas genómicas PureLink® es un kit comercial que permite un aislamiento eficiente del ADN total en aproximadamente 40 minutos de una variedad de muestras de plantas, como espinacas, tomate, soja, trigo, *Arabidopsis* y hongos, este kit hace uso del detergente SDS. Todo el protocolo se basa en la centrifugación de columnas de rotación en ausencia de disolventes orgánicos. El kit PureLink® Genomic Plant DNA Purification está diseñado para purificar el ADN de hasta 100 mg de tejido vegetal (Invitrogen, 2012).

Tabla 2 Cantidad de ADN obtenido para diferentes muestras usando el kit comercial PureLink.

Material vegetal	Rendimiento del ADN (ul/ml)
Espinacas	2.0 - 2.5
Arabidopsis thaliana	1.8 - 3.1
Alfalfa	2.1 - 3.0
Girasol	1.6 - 4.0
Seta	1.1 - 1.4
Soja	0.3 - 2.0
Trigo	9.2 - 14.6
Maíz	4.4 - 6.6
Tomate	1.0 - 2.3

Fuente: Invitrogen (2012)

1.2.17 Métodos de evaluación del ADN

1.2.17.1 Cuantificación mediante espectrofotometría

El espectrofotómetro se funda en la transmisión de la luz a través de una solución para determinar la concentración de un soluto presente en la misma. Por lo tanto, para la cuantificación de material genético la absorbancia máxima de las soluciones de ADN y ARN corresponde a 260 nm y la de las soluciones de proteínas, a 280 nm. Dado que las soluciones de ADN y ARN absorben parcialmente la luz a 280 nm y las que contienen proteínas hacen lo propio a 260 nm, el cociente de los valores obtenidos a 260 nm y a 280 nm (A_{260}/A_{280}) proporciona una estimación del grado de pureza de los ácidos nucleicos. Los cocientes A_{260}/A_{280} respectivos del ADN y el ARN puros son aproximadamente de 1,8 y 2,0. Con un paso de luz de 10 mm y una longitud

de onda de 260 nm, una absorbancia $A = 1$ corresponde aproximadamente a 50 $\mu\text{g/ml}$ de ADN bicatenario, 37 $\mu\text{g/ml}$ de ADN monocatenario, 40 $\mu\text{g/ml}$ de ARN o 30 $\mu\text{g/ml}$ de oligonucleótidos. Si la muestra también contiene proteínas, el cociente A_{260}/A_{280} será considerablemente inferior a dichos valores y no podrá determinarse con exactitud la cantidad de ácidos nucleicos (Somma, 2012).

Cuantificación y determinación de la calidad de ADN por el espectrofotómetro NanoDrop. En algunos laboratorios se cuenta con un equipo espectrofotómetro llamado Nanodrop que ha proporcionado un avance en la espectrofotometría, ya que es un espectrofotómetro de micro volumen para medir ADN, ARN y proteínas, el Nanodrop permite leer directamente 1 a 2 microlitros de muestras sin dilución, siendo un instrumento de precisión con simplicidad y velocidad, lo que lo convierte en una excelente opción para la evaluación del ADN. Este sistema de medición emplea la tensión superficial para mantener la muestra estática entre dos fibras ópticas lo que permite la medición de muestras altamente concentradas sin la necesidad de utilizar diluciones (Thermo Fisher Scientific, 2016).

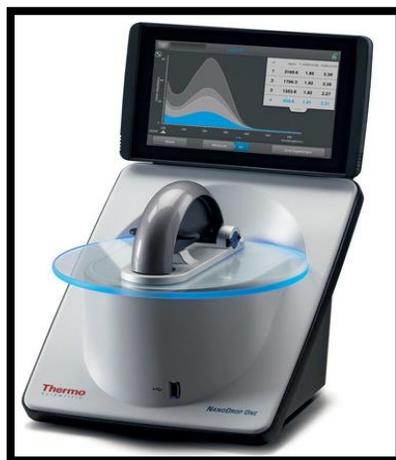


Figura 4. Espectrofotómetro NanoDrop.

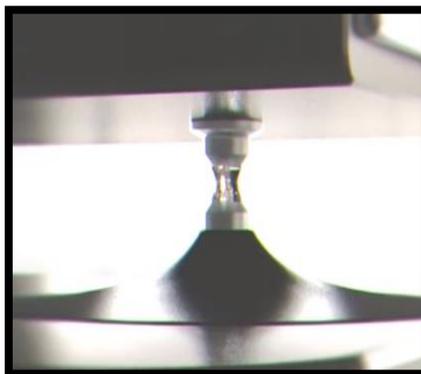


Figura 5. Pedestales del NanoDrop.

1.2.17.2 Cuantificación mediante fluorimetría

La cuantificación mediante fluorímetro se basa en la adición de un compuesto llamado DAPI (*4',6-diamino-2-fenilindol*) a una solución de ADN. El DAPI es un compuesto que se une a la molécula de ADN como una sonda y que emite fluorescencia al ser excitado por el haz de luz del fluorímetro. Cuanto mayor es la fluorescencia emitida, mayor es la concentración de ADN y por tanto, mayor la concentración de ADN. La concentración más elevada de la muestra de ADN patrón se utiliza para acertar la escala arbitraria del

fluorímetro en la posición máxima y se utiliza disoluciones proporcionales de la misma para obtener otros puntos en la escala en la lectura del fluorímetro. Una vez obtenida una curva de calibración de valor del fluorímetro respecto a la concentración de muestra patrón de ADN se prosigue a la lectura de los valores de las muestras de ADN que se desea cuantificar. Por fin los valores obtenidos en la escala del fluorímetro son transformados en ug/ml de ADN según la curva patrón (Taboada, 2013).

Cuantificación de ADN por el Fluorometro Qubit 4. El Qubit está diseñado para la cuantificación de dilutos que son usados en técnicas, incluyendo secuenciación, genotipado, análisis de ARN, y PCR, el fluorometro Qubit utiliza Dyes (tintes) selectivos para la biomolécula de interés, estos tintes fluorescentes cuando se unen a la biomolécula objetivo, el sistema no detecta otras moléculas este fluorometro utiliza para la biomolécula de interés, estos tintes fluorescentes cuando se unen a la biomolécula objetivo, el sistema no detecta otras moléculas que podrían estar presentes en la muestra (Thermo Fisher Scientific, 2016).



Figura 6. Qubit™ 4 Fluorometro

1.2.17.3 Comprobación de la integridad del ADN por electroforesis

La electroforesis es la migración de partículas cargadas a través de un soporte, las cuales están sometidas a un campo eléctrico (Frifelder, 1991), los dos principales polímeros que se utilizan para la técnica de electroforesis son la agarosa (para ADN y ARN) y la acrilamida (para Proteínas). De estas dos matrices se derivan las metodologías para la realización de la electroforesis que se utiliza en varias técnicas moleculares (Zavala, 2005).

Además de conocer la cantidad y calidad del ADN por espectrofotometría, es importante conocer si el ADN obtenido está integro. La integridad del ADN se puede observar mediante electroforesis en gel de agarosa. Si el ADN está integro, se debe observar una banda estrecha cercana al pozo en que se colocó la mezcla de ADN. Si está fragmentado, se observará una banda de más de un cm de ancho o un sendero luminoso en el carril de la muestra. El ADN fragmentado dificulta la amplificación de productos de PCR de alto peso molecular y afecta la reproducibilidad de las técnicas. (Alejos et al., 2005), los geles de agarosa (de 0.8% a 2.0%) son muy útiles para separar fragmentos de ADN cuyo tamaño este comprendido en el intervalo de 300 a 10.00 pb. Tienen menor poder de resolución que geles de poliacrilamida, pero tienen un mayor rango de separación (Alagón Talaverano et al., 2008).

Los geles al someterse al campo eléctrico, migran los fragmentos de ADN según su tamaño, de modo que los fragmentos grandes migran más lentamente que los fragmentos cortos, la distancia de migración es proporcional al logaritmo del número de bases, es por eso que el tamaño real

de los fragmentos obtenidos puede calcularse partiendo de la movilidad de los fragmentos de ADN de tamaño conocido.

Comprobación de la integridad del ADN con Gel de Agarosa E-Gel al 1.2%.

Los geles de agarosa E-Gel permiten un análisis rápido y de alto rendimiento con una sensibilidad de detección de 2 a 3 ng de **muestra** de ADN por banda y un tiempo de separación de 2 a 3 veces más rápido que el de los geles convencionales. Cada gel de agarosa E-Gel contiene agarosa, electrodos, tinción de ADN SYBR seguro y un sistema de intercambio iónico sin amortiguación empaquetado dentro de un cassette desechable seco. La tecnología E-Gel no requiere ninguna preparación de gel o tampón ni pasos de colado de gel.



Figura 7. E-Gel™ Agarose Gels with SYBR™ Safe DNA Gel Stain, 1.2%.

1.2.18 Almacenamiento del ADN

Una vez que el ADN ha sido purificado, cuantificado y analizado mediante electroforesis, una parte de la muestra se puede almacenar a 4 °C para los análisis inmediatos y el material restante a -20 °C o -80 °C, para una preservación por varios meses. En este último caso es conveniente que el ADN se conserve en soluciones con baja concentración de sales (low TE) para inhibir la acción de DNAsas contaminantes. (Alejos et al., 2005)

1.2.19. Ventaja y desventajas de los protocolos de extracción tradicionales y comerciales

Una de las ventajas de utilizar métodos tradicionales es su bajo costo, así como un alto rendimiento. Sin embargo, en ocasiones el material obtenido está fragmentado. Estos métodos son susceptibles de contaminación, variación y errores por los múltiples pasos de manipulación (Störmer et al., 2007). El rendimiento de los kits depende del tipo de tejido y la cantidad de muestra inicial, así como de la capacidad de unión de la membrana. En los últimos años ha aumentado el uso de los métodos de extracción comerciales debido a que la matriz permite capturar selectivamente al ADN haciendo posible obtener un extracto de alta pureza con moléculas íntegras; al tiempo que se reduce el número de pasos en la extracción y se disminuye la posibilidad de contaminación con ADN o ARN exógeno. Independientemente del método de extracción que se utilice, lo importante es realizar cada paso con cuidado para obtener ADN integro y puro que permita llevar a cabo las técnicas posteriores. (Alejos et al., 2005).

Tabla 3. Ventajas y desventajas de los métodos tradicionales y comerciales de extracción y purificación de ADN.

CONDICIÓN	MÉTODOS TRADICIONALES	MÉTODOS COMERCIALES
Material inicial	Miligramos o gramos	De 50 a 250 mg como máximo
Uso de sustancias tóxicas	En la mayoría de los protocolos	Se evita utilizarlas
Tiempo de proceso	Hasta varios días debido a los numerosos pasos a desarrollar	Menor a 3 hrs
Integridad (considerando tejido en buen estado de conservación)	Se requiere experiencia para evitar que el ADN se fragmente	Generalmente se obtienen moléculas de ADN de alto peso molecular
Rendimiento	Varios microgramos, aunque puede incluir moléculas de ADN fragmentadas	Varios nanogramos pero en su mayoría con moléculas de ADN integras
Inhibición enzimática	Los reactivos utilizados para la extracción fácilmente se acarrean con la muestra e interfieren con aplicaciones posteriores	Poco frecuente si se siguen los pasos y cantidades recomendadas por el fabricante
Automatización	Poco factible por los múltiples pasos y el uso de solventes corrosivos	Altamente recomendable
Costo	Bajo	Alto

N.

Fuente: Alejos *et al.* (2005)

CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 CAMPO DE VERIFICACIÓN

2.1.1 Lugar de ejecución

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Cambio climático, área de Biología Molecular, de la Universidad San Antonio Abad del Cusco, facultad de Ciencias Agrarias, Escuela Profesional de Zootecnia, como parte del proyecto “Efectos del cambio climático sobre los sistemas de producción en la sierra sur del Perú”.

2.1.2 Zona de muestreo

Las muestras botánicas de las especies de la comunidad vegetal tipo tolar se obtuvieron en el fundo “Qena”, ubicado en distrito de Callalli, provincia de Cayoma, departamento de Arequipa.

- Altitud: 3 800 m.s.n.m.
- Coordenadas: 15° 30' 26.34" S, 71° 26' 46.42" W
- UTM: 8284063 237574 19L



Figura 8. Mapa del distrito de Callalli, provincia de Cayoma.

Fuente: Wikipedia.

2.1.3 Unidades de estudio

Las trece especies vegetales de la formación vegetal tipo tolar del fundo Qena, distrito de Callalli – Arequipa que se convierten las unidades de estudio. Con cada una de estas unidades de estudio se realizaron pruebas de extracción y evaluación del ADN.

Tabla 4. Especies vegetales (unidades de estudio)

FAMILIA	GENERO	ESPECIE	NOMBRE COMÚN
Asteraceae	<i>Parastrephia</i>	<i>Parastrephia sp.</i>	Romero t'ola
Asteraceae	<i>Baccharis</i>	<i>Baccharis mycrophylla</i>	T'ola
Rosaceae	<i>Margyricarpus</i>	<i>Margiricarpus strictus</i>	Kanlliblaco
Rosaceae	<i>Margyricarpus</i>	<i>Margyricarpus pinnatus</i>	Kanlli
Rosaceae	<i>Alchemilla</i>	<i>Alchemilla pinnata</i>	Sillosillo
Fabaceae	<i>Trifolium</i>	<i>Trifolium amabile</i>	Layo
Poaceae	<i>Muhlebergia</i>	<i>Muhlebergia fastigiada</i>	Gramma blanca
Poaceae	<i>Muhlebergia</i>	<i>Muhlebergia peruviana</i>	Llapa pasto
Poaceae	<i>Paspalum</i>	<i>Paspalum pygmaeum</i>	Sara sara
Poaceae	<i>Festuca</i>	<i>Festuca orthophylla</i>	Iruichu
Poaceae	<i>Calamagrostis</i>	<i>Calamagrostis vicunarun</i>	Crespillo
Poaceae	<i>Poa</i>	" <i>Poa candamoana</i>	Cebadilla"; K'acho
Poaceae	<i>Bromus</i>	<i>Bromus sp.</i>	Cebadilla

Fuente: elaboración propia

2.2 MATERIALES

2.2.1 Material biológico

Se recolectaron muestras de plantas jóvenes de las trece especies vegetales de la formación vegetal tipo tolar del fundo Qena, distrito de Callalli – Arequipa, con coordenadas de 15° 30' 26.34" S, 71° 26' 46.42" W y una altitud de 3800m.

2.2.2 Materiales usados para la colección de muestra

- Bolsas Ziploc (sello hermético)
- Bolsas de papel
- Guantes de goma
- Papel toalla
- Tijeras
- Lapicero tinta indeleble
- Alcohol 96°
- Cinta para rótulos
- Bolsas
- Pico.

2.2.3 Materiales y equipos de Laboratorio para la extracción

Equipos

- Balanza analítica (Sartorius-Modelo SP 2245)
- Homogeneizador para tubos (Bead Ruptor 12)
- Cámara extractora
- Termo bloque
- Centrifuga
- Refrigeradora a -20°C

- Máquina para hacer hielo
- Congeladora a -80°C
- Vortex
- Máquina de hielo
- Espectrofotómetro NanoDrop
- Fluorómetro Qubit 4

Reactivos químicos

- Alcohol 96°
- Agua ultra pura
- PureLink® Plant Total DNA Purification Kit (Buffer de resuspension (R2))
- Buffer de precipitación (N2)
- Buffer de unión (B4)
- Buffer de lavado (W4)
- Buffer de lavado (W5)
- Buffer de elución
- 10 mM Tris-HCl
- pH 8.5 (E1)
- 20% SDS
- RNasa A (20 mg/mL RNase A in 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 10 mM EDTA)

Otros materiales

- Espátulas
- Pinzas

- Tijeras
- Gradillas y soportes para tubos
- Guantes de Nitrilo
- Tubo de 1,5 y 2 ml (Eppendorf y Axygen)
- Juego de micropipetas (Eppendorf y Rainin)
- Matraces Erlenmeyer(Pyrex®)
- Probetas de 10, 100, 1000 ml (Pyrex®)
- Vasos precipitados “Beakers”(Pyrex®)
- Bolsas de polipropileno
- Puntas plásticas de 10, 200 y 1000 µl. (Axygen)
- Puntas cortadas 200 µl. (Axygen)
- Racks Polypropylne, (Axygen, Eppendorf)
- Tubos eppendorf de 1.7, 2 ml, (Eppendorf).
- Morteros de porcelana
- Luna de reloj.
- Pipetas automaticas
- Tips de 10, 20, 100, 200.
- PureLink® Spin Cartridges with Collection Tubes
- PureLink® Wash Tubes)

Materiales para la cuantificación y electroforesis

Reactivos químicos

- Agua ultra pura

- Gel de agarosa al 0.8%
- Qubit buffer
- Qubit reagent (dyes)

Material de laboratorio

- Cajas de dilución,
- Gradillas y soportes para tubos
- Papel Tissue, (Kimwipe®)
- Racks de polipropileno
- Vaso de precipitado, Juego de micropipetas, puntas de 10 ul. (Axygen).

Equipos

- Fluorometro Qubit
- Espectrofotómetro NanoDrop
- E-Gel Sistema de Electroforesis en agarosa

2.3 METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

2.3.1 Recolección y transporte de muestra de las muestras.

La recolección de las especies vegetales de la comunidad tipo tolar, se realizó en los tolares ubicados en el fundo Qena Callalli - Arequipa los entre los meses de marzo y abril de los años 2018 y 2019. Se seleccionaron en forma aleatoria muestras de plantas enteras con sustrato que componen la comunidad tipo tolar, en los meses que presentan lluvia en la zona y debido a que son exigentes los protocolos de análisis en laboratorio fue necesario obtener plantas jóvenes.

La especie botánica seleccionada se extrajo del suelo con sustrato para mantener la planta viva, cubriendo la parte radicular con sustrato de tierra en una bolsa de papel, después de asegurar la integridad de la muestra biológica se embolsaron y fueron rotulados con sus respectivos códigos de identificación, del mismo modo se tomaron muestras vegetales para realizar la verificación morfológica de cada una de las especies seleccionadas. El material biológico obtenido se puso a resguardo y se transportaron al Laboratorio de Cambio Climático área de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Agrarias – UNSAAC.

2.3.2 Procesamiento de las muestras

En el laboratorio, el material vegetal obtenido fue puesto en orden para su identificación y posteriormente se seleccionaron las hojas mas verdes, este órgano botánico seleccionado de cada planta fue limpiado minuciosamente con ayuda de gasas estériles y agua destilada. El material vegetal limpio se

transfiere a una placa Petri estéril y se conservó a -85°C hasta realizar el procedimiento de la purificación de ADN.

2.3.3 Protocolos de extracción de ADN

PRÓTOCOLO 1	PRÓTOCOLO 2	PRÓTOCOLO 3
Invitrogen PureLink Kit de Extracción de ADN Genómico en Plantas.	Invitrogen PureLink Kit de Extracción de ADN Genómico en Plantas. + Lisador celular programa 1 Velocidad: 6 metros por segundo Tiempo de ciclo: 110 seg Número de ciclos: 1	Invitrogen PureLink Kit de Extracción de ADN Genómico en Plantas. + Lisador celular programa 2 Velocidad: 6 metros por segundo Tiempo de ciclo: 60 seg Número de ciclos: 4

Los protocolos de Extracción de ADN se estandarizaron a partir de un kit comercial PureLink y consta de los siguientes pasos:

- a) Transferir la muestra botánica de la placa Petri que se encuentra a -85°C a un mortero de porcelana estéril para su inmediata trituración.
- b) Pesar 100mg de muestra botánica y agregar 250 ul de buffer de resuspensión (R2).
- c) Homogenizar el lisado con el homogeneizador de tejidos bead Ruptor probando **2 velocidades**.
- d) Añadir 15 ul 20% SDS y 15 ul RNasa A (20mg/ml) al lisado.
- e) Incubar el lisado a 55°C durante 15 minutos en un termo bloque para completar la lisis.

- f) Centrifugar el lisado a alta velocidad durante 5 minutos para remover los materiales insolubles.
- g) Transferir el sobrenadante claro a un nuevo tubo de centrifuga de 1.5 sin perturbar el sedimento y añadir 100 ul Buffer de precipitación (N2). Mezclar por agitación e incubar en hielo por 5 minutos.
- h) Centrifugar a máxima velocidad en una microcentrífuga por 5 minutos a temperatura ambiente para para producir un lisado claro.
- i) Transferir 250 ul de lisado claro a un nuevo tubo estéril de microcentrífuga y añadir 375 ul de Buffer unión (B4) con etanol para el lisado, mezclar bien.
- j) Agregar muestra a un cartucho de centrifugación PureLink en un tubo colector.
- k) Centrifugar el cartucho a 10000 x g por 30 segundos a temperatura ambiente. Descartar el fluido y colocar el cartucho en un tubo de lavado.
- l) Añadir 500 ul de Buffer de lavado (W4)
- m) Centrifugar el cartucho a 10000 x g por 30 segundos a temperatura ambiente. Desechar el fluido a través del tubo de lavado y colocar la columna de nuevo en el tubo.
- n) Añadir 500 ul de Buffer de lavado (W5) con etanol.
- o) Centrifugar el cartucho a 10000 x g por 30 segundos a temperatura ambiente. Desechar el fluido a través del tubo de lavado y colocar la columna de nuevo en el tubo.
- p) Repetir el paso 14 y 15 una vez más.

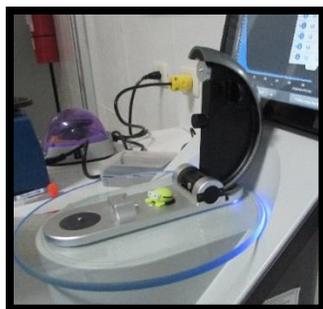
- q) Centrifugar el cartucho a máxima velocidad durante 2 minutos, temperatura ambiente para eliminar cualquier residuo del Buffer (W5) y proceder con la elución.
- r) Colocar el cartucho de centrifugación en un tubo estéril de micro centrifuga libre de 1.5 ml libre de DNasa. Para seguir con la elución.
- s) Añadir 100 ul de Buffer de elución (E1) o agua destila (pH > 7.0).
- t) Incubar a temperatura ambiente por 1 minuto. Centrifugar a máxima velocidad por 1 minuto.
- u) Para recuperar más ADN realizar una segunda elución usando 100 ul de Buffer de elución (E1) y centrifugar a máxima velocidad por 1 minuto.
- v) Almacenar el ADN purificado a -20° C o usar para las aplicaciones posteriores deseadas

2.3.4 Evaluación de la pureza, concentración e integridad de ADN

Evaluación de la pureza y concentración del ADN por espectrofotometría

Las muestras fueron analizadas por un Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, 2009): Todas las lecturas de absorbancia se hicieron en un volumen final de 1 ml. En base a las lecturas de absorbancia a 230, 260, 280 y 320 nm se determinaron los valores de proporción de 260nm/280nm y 260nm/230nm. Los valores de las proporciones deben estar de 1.7 a 1.9 en el primer caso y en el segundo debe ser igual o mayor de 2.0 para que el DNA genómico sea considerado de buena calidad (Doyle y Doyle, 1990; Manning, 1991)

1. Antes de tomar alguna medición con el instrumento, levante el brazo del instrumento y limpie los pedestales superior e inferior con una toallita de laboratorio.



2. En la pantalla de inicio seleccione ADN.



3. Pipetear 1 ul de solución blanco en pedestal inferior y baje el brazo.

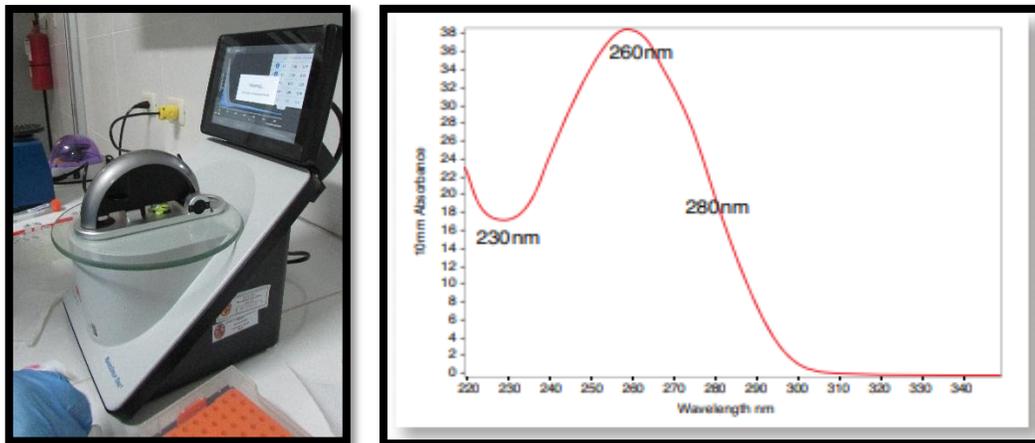


4. Toque **Blanco** y espere a que termine la medición.

5. Levante el brazo y limpie ambos pedestales con una toallita
6. Pipetee 1 ul de solución de muestra en el pedestal y baje el brazo.



7. Comience la **Medición** de la muestra.



8. Cuando ya terminé la medición de las muestras, **toque Finalizar experimento y exportar**
9. Levante el brazo y limpie ambos pedestales con una toallita.

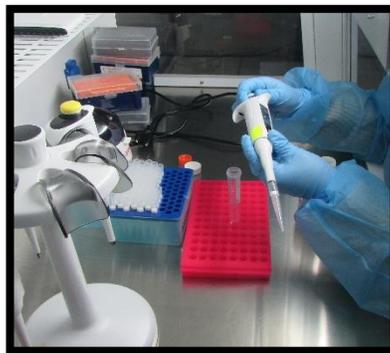
Evaluación de la concentración del ADN por fluorometría

Las muestras fueron analizadas por el fluorómetro Qubit 4, se prepara previamente una solución de trabajo para el conjunto de muestras y estándares, donde se calcula 199 ul de Buffer qubitds DNAsas 1 ul de colorante para los estándares del kit y las muestras a ser analizadas. Antes de leer las muestras se debe calibrar el equipo, para ello se lee los estándares 1 y 2.

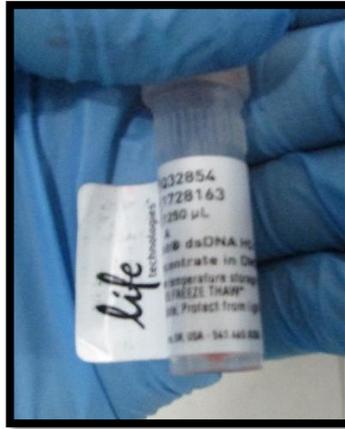
1. Estándares.



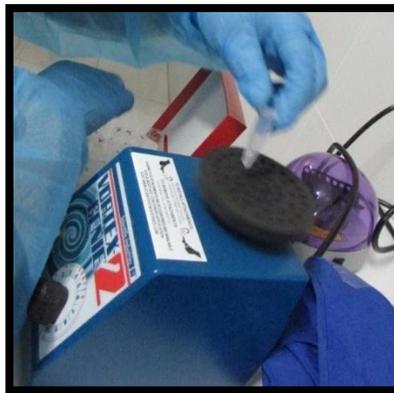
2. Calculando 199 ul de buffer Qubit dsDNS + 1 ul colorante) + 2 volúmenes extras de 199 + 1 ul colorante = volumen total.



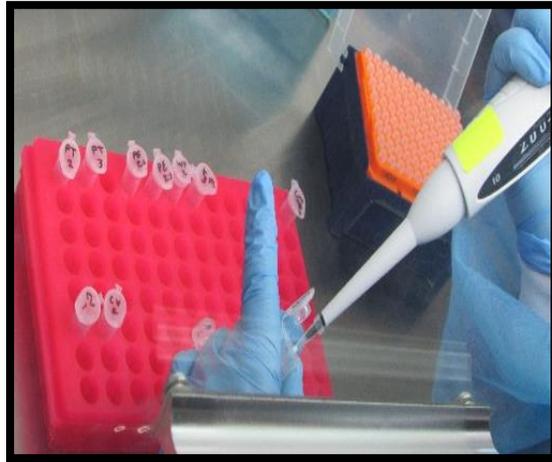
3. Agregar la solución de colorante al final y protegerla de la luz siempre.



4. Homogenizar el colorante en vortex y darle un espin corto en centrifuga, homogenizar también la solución final en el vortex.



5. Etiquetar un tubo para cada muestra y uno para cada estándar, tomar 198 ul de la solución trabajo para cada muestra en un tubo nuevo y agregarle 2 ul de muestra, homogenizar en vortex.

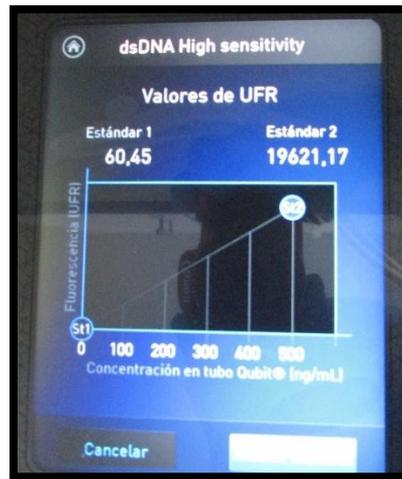


6. El primer menú de opciones que el equipo muestra es el menú de ensayos, si se trata de cuantificar AND presionar sobre la pantalla ADN de doble cadena HS y luego Leer datos.



Foto: Qubit 2.0

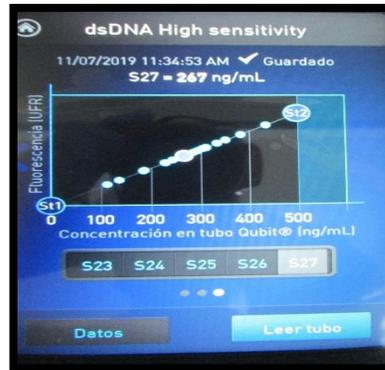
7. Antes de leer las muestras se debe calibrar el equipo, para ello se lee la mezcla de los estándares # 1 y 2 con 190 ul de solución de trabajo y con 10 ul de cada estándar (homogeneizar cada estandar en vortex y darle un espín ligero antes de hacer la mezcla)



8. El equipo pide leer el estándar # 1 y 2, los valores de las muestras deben estar en el rango de los valores de la curva de calibración. Se coloca el tubo del estándar en la cavidad de la parte superior, se cierra la cubierta y se presiona en Leer estándar.



9. Se coloca los tubos con la mezcla y se hace la lectura de la concentración del ADN.



Determinación visual de la pureza y concentración del ADN genómico por electroforesis en geles de agarosa al 1.2%.

- a) Preparar muestras con la cantidad recomendada de ADN y el volumen de muestra
- b) Retirar el gel de agarosa E-Gel™ del paquete y retire el peine del cassette. Inserte el gel en la base, comenzando desde el borde derecho del casete. El logotipo de Invitrogen debe ubicarse en la parte inferior de la base. Presione firmemente en la parte superior e inferior para asentar el gel la base. Una luz roja constante se ilumina en la base si el gel está insertado correctamente
- c) Enchufar el E-Gel™ PowerBase™ v.4 en un tomacorriente utilizando el enchufe del adaptador en la base.
- d) Cargar 20 µl de muestra preparada en cada pocillo.
- e) Cargar 500-700 ng de marcadores de peso molecular de ADN apropiados.
- f) Cargar 20 µl de agua en los pozos vacíos restantes

2.4 DISEÑO ESTADÍSTICO

El diseño estadístico para este trabajo de investigación es un diseño completamente al azar **DCA**

$$y_{ij} = u + \alpha_i + e_{ij}$$

y_{ij} : Concentración y calidad de ADN

u : Promedio.

α_i : Protocolo de extracción. (Tiempos y ciclos de homogenización)

e_{ij} : Error residual.

El análisis estadístico fue llevado a cabo, usando el paquete estadístico SAS versión 9.0, y el análisis de varianza se realizó usando la prueba de LSD.

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Evaluación de los protocolos en relación a la concentración y pureza del ADN

3.1.1 Extracción de ADN para *Parastrephia lepidophylla*.

Para *Parastrephia lepidophylla* analizaron los 3 protocolos de extracción, donde no se encontró una diferencia significativa en referencia a la concentración (Tabla 5), obteniendo de los 3 protocolos buenos rendimientos en la concentración (ng/ul)

Tabla 5. Comparación de medias de la concentración de ADN de los 3 protocolos para *Parastrephia lepidophylla*.

<i>Parastrephia lepidophylla</i>	Nanodrop	Qubit
	Media (ng/ul)	Media (ng/ul)
Protocolo 1	30.27	33.33
Protocolo 2	24.1	24.13
Protocolo 3	25.63	27.07

Respecto a la calidad y pureza del ADN obtenido, no se encontró diferencia estadística, teniendo ratios A260/280 dentro de los rangos óptimos superiores a 1.5 en los 3 protocolos (Figura 9), lo que indica que el ADN no está contaminado con polifenoles y otros metabolitos secundarios (Porebski, et al. 1997) y los ratios de absorbancia A260/230 son menores de 2.0 lo que indicaría que el ADN está contaminado con polisacáridos y polifenoles (Lomis, 1974).

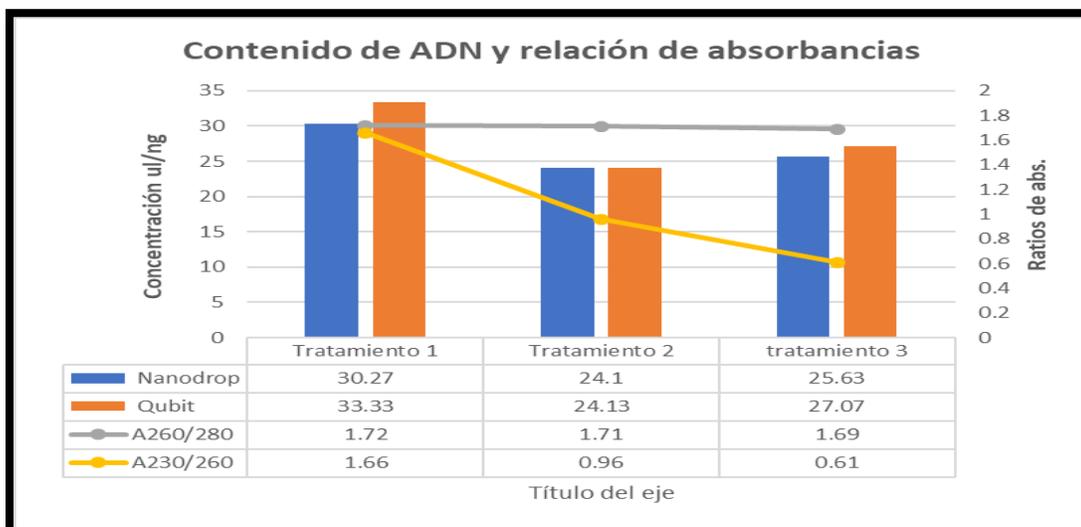


Figura 9. Gráfica del contenido de ADN genómico y relación de absorbancias (A260/280 y A260/230) de *Parastrephia lepidophylla* para cada tratamiento de extracción.

La tribu asterácea a la que pertenece la *Parastrephia Lepidophylla* presentan metabolitos secundarios como triterpenos, flavonoides y fenoles, (Alvarenga et al., 2001); citado por Jaro (2017) los cuales pueden dificultar el rendimiento de la obtención del ADN respecto a la cantidad y calidad, sin embargo, el ADN obtenido presentó excelentes rendimientos en comparación con los resultados en las especies vegetales obtenidas usadas por el kit comercial pureLink (Tabla 2). No obstante, los ratios de absorbancia A230/260 presentaron contaminación en la extracción de ADN de *Parastrephia Lepidophylla*, siendo el protocolo 1 el que presentó más pureza, esto puede ser debido a que estas especies se caracterizan por tener una gran variación estacional en el contenido de nutrientes, en cuanto a materiales minerales, extracto etéreo y extracto libre de nitrógeno, se reportan niveles altos en época seca y bajos en época húmeda, (Abasto, 1993). Además, se demostró que el pastoreo frecuente reduce la concentración de taninos totales en las hojas de *Parastrephia Lepidophylla* (Haro, 2017), sumando que se

seleccionaron especies vegetales jóvenes, ya que el tejido joven contiene más células por unidad de peso que el tejido viejo y posee menos polisacáridos y polifenoles que dificultan la extracción (Alejos *et al*, 2005)

3.1.2 Extracción de ADN para *Baccharis mycrophylla*

Para *Baccharis mycrophylla* se logró purificar ADN de los 3 protocolos estudiados, donde estadísticamente no se presentó diferencias significativas en la concentración de ADN (Tabla 6).

Tabla 6. Comparación de medias de la concentración de ADN de los 3 protocolos para *Baccharis mycrophylla*

<i>Baccharis mycrophylla</i>	Nanodrop	Qubit
	Media (ng/ul)	Media (ng/ul)
Protocolo 1	23.37	21.03
Protocolo 2	15.8	13.26
Protocolo 3	15.63	12.53

La comparación de espectrofotometrías en los tres protocolos de extracción, indica que el protocolo uno presenta las ratios de absorbancia óptimos en A260/280 y A260/230 (1.68 y 1.73 respectivamente) como se muestra en la (figura 11), Los ratios de absorbancia A260/280 fueron superiores a 1.5 en los 3 protocolos, lo que indica que el ADN no está contaminado con polifenoles y otros metabolitos secundarios (Porebski, et al. 1997) y los ratios de absorbancia A260/230 son menores de 2.0 lo que indicaría que el ADN está contaminado con polisacáridos y polifenoles (Lomis, 1974).

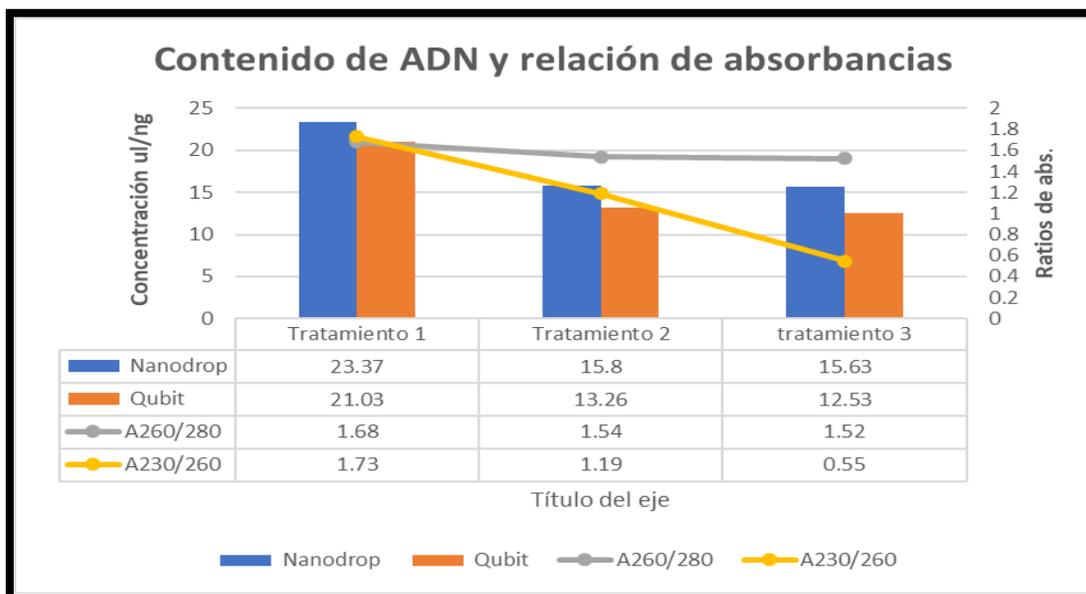


Figura 10. Gráfica del contenido de ADN genómico y relación de absorbancias (A260/280 y A260/230) de *Baccharis mycophylla* para cada uno de los protocolos.

El género *Baccharis* ha sido objeto de gran cantidad de estudios fitoquímicos y de actividad biológica, entre los compuestos reportados principalmente se encuentran flavonoides, diterpenos y triterpenos (Verdi, et al. 2005). También se han obtenido cumarinas y aceites esenciales (Verdi et al., 2005; Abad y Bermejo, 2007). Todos estos metabolitos secundarios dificultan la acción enzimática, la misma que es importante en el proceso de extracción de ADN (Collins, et al. 1992). Sin embargo, se obtuvieron buenos rendimientos en la extracción de ADN quizá debido a que la recolección de muestras fue de especies jóvenes que presentan menos polisacáridos y metabolitos secundarios (Alejos, et al. 2005), además los metabolitos secundarios se producen como respuestas fisiológicas durante las interacciones con su entorno biótico y abiótico. Por lo tanto la abundancia de compuestos producidos por la planta dependerá de las estrategias de vida y de defensa a las que se enfrenta (Oberlies y Kroll, 2004., citados por Civjan, 2012)

sumando que cada planta mantiene condiciones diferentes del entorno, también llamado microambiente, por lo tanto deben enfrentar diferentes situaciones, defenderse de los posibles depredadores, sobrevivir a factores ambientales tales como la radiación UV, temperatura, factores bióticos y abióticos en general (Gliessman, 1998).

3.1.3 Extracción de ADN para *Margiricarpus strictus*.

Para *Margiricarpus strictus* se evaluaron los tres protocolos de extracción de ADN, donde no se encontró diferencia estadística en lo que respecta a la concentración de ADN, tanto en lecturas de NanoDrop y Qubit, (tabla 7) presentando buenos rendimientos en la cantidad de ADN (ng/ml) (figura 11).

Tabla 7. Comparación de medias de la concentración de ADN de los 3 protocolos para *Margiricarpus strictus*.

<i>Margiricarpus strictus</i>	Nanodrop	Qubit
	Media (ng/ul)	Media (ng/ul)
Protocolo 1	29.27	29.63
Protocolo 2	27.05	27.23
Protocolo 3	31.9	30.96

Para determinar la pureza del ADN los ratios de A260/280 no presentaron diferencias significativas, obteniendo resultados similares en los tres protocolos (1.72, 1.72, 1.71, respectivamente), estos rendimientos son adecuados e indican que el ADN no está contaminado con proteínas y no degradado (Sambrook, et al. 1989) y los ratios A260/230 el protocolos 3 presento mejores rendimientos como se observa en la (Figura 11), sin embargo los 3 protocolos obtuvieron bajos resultados lo que indicaría que el ADN extraído está contaminado con polisacáridos y polifenoles. (Loomis, 1974)

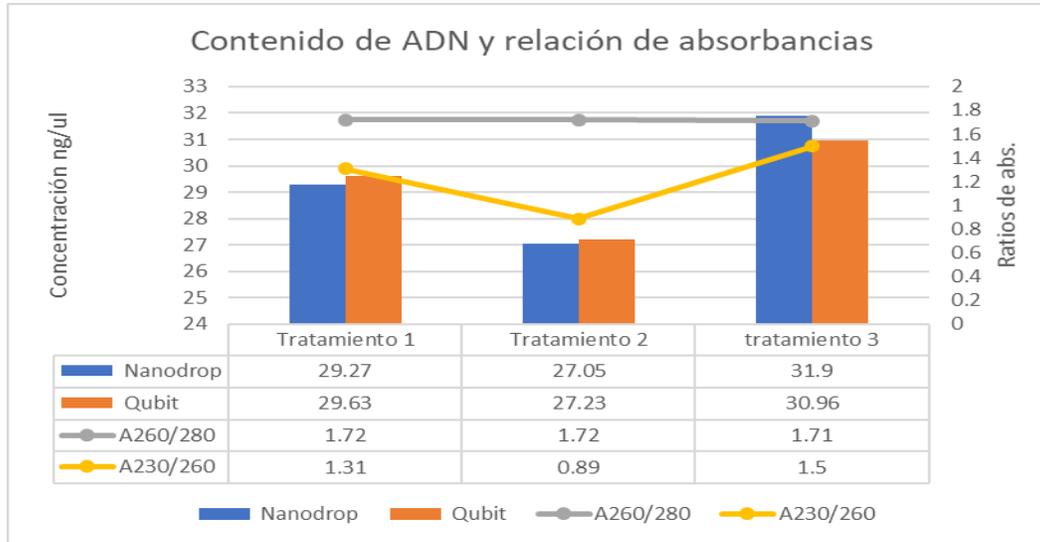


Figura 11. Gráfica del contenido de ADN genómico y relación de absorbancias (A260/280 y A260/230) de *Margyricarpus strictus* para cada uno de los tratamientos.

3.1.4 Extracción de ADN para *Margyricarpus pinnatus*.

Para *Margyricarpus pinnatus* se compararon 3 protocolos para purificar su ADN total, donde no se encontraron diferencias estadísticas en lo que respecta a la concentración (Tabla 8), donde se presentaron rendimientos bajos (Figura 12)

Tabla 8. Comparación de medias de la concentración de ADN de los 3 protocolos para *Margyricarpus pinnatus*.

<i>Margyricarpus pinnatus</i>	Nanodrop	Qubit
	Media (ng/ul)	Media (ng/ul)
Protocolo 1	1.53	0.057
Protocolo 2	1.15	0.77
Protocolo 3	2.05	1.21

Para la calidad y pureza del ADN purificado no hubo diferencias estadísticas en las ratios de absorbancia A260/280, obteniendo rendimientos bajos lo cual indicaría contaminación con polifenoles y otros metabolitos secundarios (Porebski, *et al.* 1997) y también indica que el ADN está contaminado con proteínas y está degradado (Sambrook *et al.* 1989). En los ratios A260/230 se

encontró que los rendimientos fueron bajos, esto indicaría que el ADN está contaminado con polisacáridos y polifenoles (Loomis, 1974) (figura 12).

Estos bajos rendimientos se podrían explicar debido a que el *Margyricarpus pinnatus* presenta gran cantidad de metabolitos secundarios como quinonas, flavonoides, leucoantocianidinas, saponinas (Castañeda y Condori, 2010), estos metabolitos secundarios y polifenoles inhiben la acción enzimática, la cual es la importante para el proceso de extracción de ADN (Collins, *et al.* 1992).

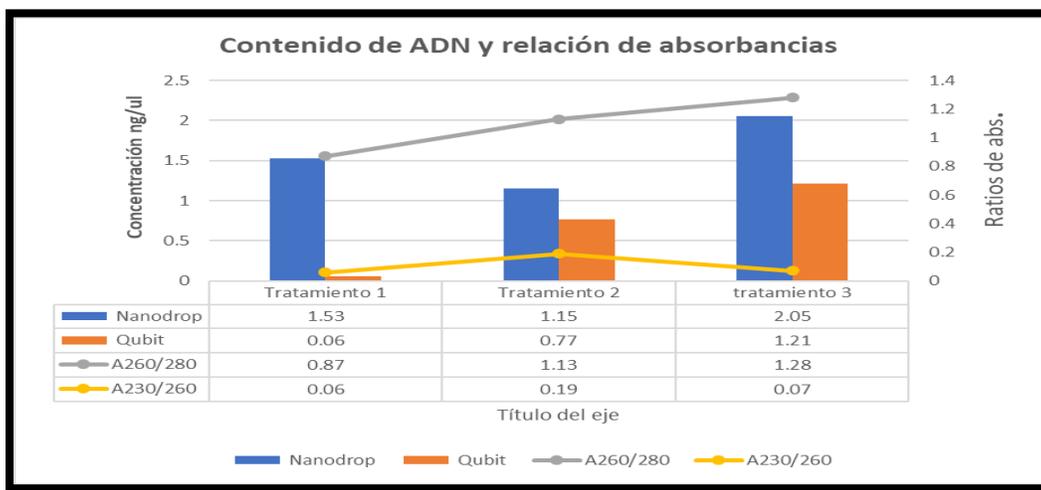


Figura 12. Gráfica del contenido de ADN genómico y relación de absorbancias (A260/280 y A260/230) de *Margyricarpus pinnatus* para cada uno de los tratamientos.

3.1.5 Extracción de ADN para *Alchemilla pinnata*

Para *Alchemilla pinnata* se analizaron 3 protocolos de extracción, donde no se encontraron una diferencia significativa con respecto a la concentración de ADN total (Tabla 9), los rendimientos obtenidos fueron bajos en comparación con otras especies de pastizales (figura 13), no obstante se obtuvieron resultados similares a los obtenidos por el laboratorio Invitrogen haciendo uso de su kit comercial de extracción de ADN pure link (Tabla 2).

Rendimientos de ADN total a partir de 100 mg de varias muestras de plantas usando PureLink.

Tabla 9. Comparación de medias de la concentración de ADN de los 3 protocolos para *Alchemilla pinnata*.

<i>Alchemilla pinnata</i>	Nanodrop	Qubit
	Media (ng/ul)	Media (ng/ul)
Protocolo 1	3.1	1.81
Protocolo 2	9.2	4.14
Protocolo 3	8.7	2.17

Para la pureza del ADN extraído no se encontraron diferencias estadísticas, presentados ratios A260/280 (1.33, 1.38, 1.26) respectivamente para cada uno de los tratamientos, lo que indicaría que lo cual indicaría contaminación con polifenoles y otros metabolitos secundarios (Porebski, *et al.* 1997) y ratios A260/230 (0.39, 0.49, 0.88) respectivamente para los 3 tratamientos, resultando en un nivel bajo de rendimiento (Figura 13), esto indicaría que el ADN está contaminado con polisacáridos y polifenoles (Loomis, 1974).

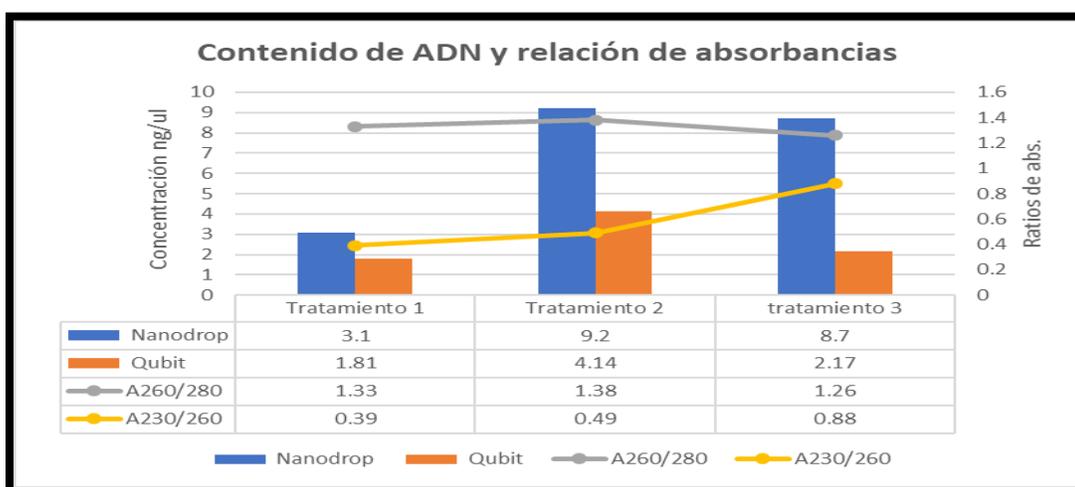


Figura 13. Gráfica del contenido de ADN genómico y relación de absorbancias (A260/280 y A260/230) de *Alchemilla pinnata* para cada uno de los tratamientos

La familia Rosaceae se ha caracterizado químicamente, en la taxonomía tradicional, por la presencia de taninos, proantocianidinas, ácido elágico y gálico, saponinas triterpénicas, sorbitol, triptenos y esteroides (Cronquist, 1981) y para el género *Alchemilla* se ha reportado la presencia de compuestos fenólicos en gran número de especies (Ayaz y Hayirlioglu, 2001), y la presencia de presencia de metabolitos secundarios tales como los polifenoles y taninos, los cuales inhiben la acción enzimática, la misma que es esencial en el proceso extracción y purificación del ADN (Collins *et al.*, 1992). Esto sería una de las razones por la cual esta especie obtuvo rendimientos bajos y contaminación en su ADN.

3.1.6 Extracción de ADN para *Trifolium amabile*

Para el *Trifolium amabile* se comparó tres protocolos de extracción de ADN, encontrando una diferencia estadística con respecto a la concentración de ADN total para cada tipo de extracción, siendo el protocolo 2 y 3 superiores al protocolo 1 (Tabla 10) los resultados fueron de mejores rendimientos en comparación con los obtenidos con la leguminosa alfalfa donde se obtuvieron 3 ng/ul haciendo uso del kit comercial de extracción de ADN PureLink (Invitrogen, 2012).

Tabla 10. Comparación de medias de la concentración de ADN de los 3 protocolos para *Trifolium amabile*.

<i>Trifolium amabile</i>	Nanodrop		Qubit	
	Media (ng/ul)	Separación de medias	Media (ng/ul)	Separación de medias
Protocolo 3	9.8	a	7.1	A
Protocolo 2	9.5	a	5.83	A
Protocolo 1	3.5	b	0.62	B

Para la pureza del ADN extraído no se encontró diferencias estadísticas para los ratios de absorbancia A260/280, en los protocolos 2 y 3 fueron superiores al protocolo 1, estando al límite de considerarse un ADN puro y en los ratios

A260/230 se obtuvieron rendimientos por encima de 2 -2.1, como se muestra en la (Figura 19) lo que podría ser resultado de realizar una medición en blanco sobre un pedestal sucio en el equipo Nanodrop (Matlock, 2015). En estudios realizados en *Trifolium amabile* para estudiar su diversidad genética, se obtuvo un ADN con la calidad necesaria para realizar marcadores moleculares AFLP, usando un método CETAB (CIP, 1997) modificado, aunque el autor ni indica los rendimientos de ADN obtenidos (García, 2010)

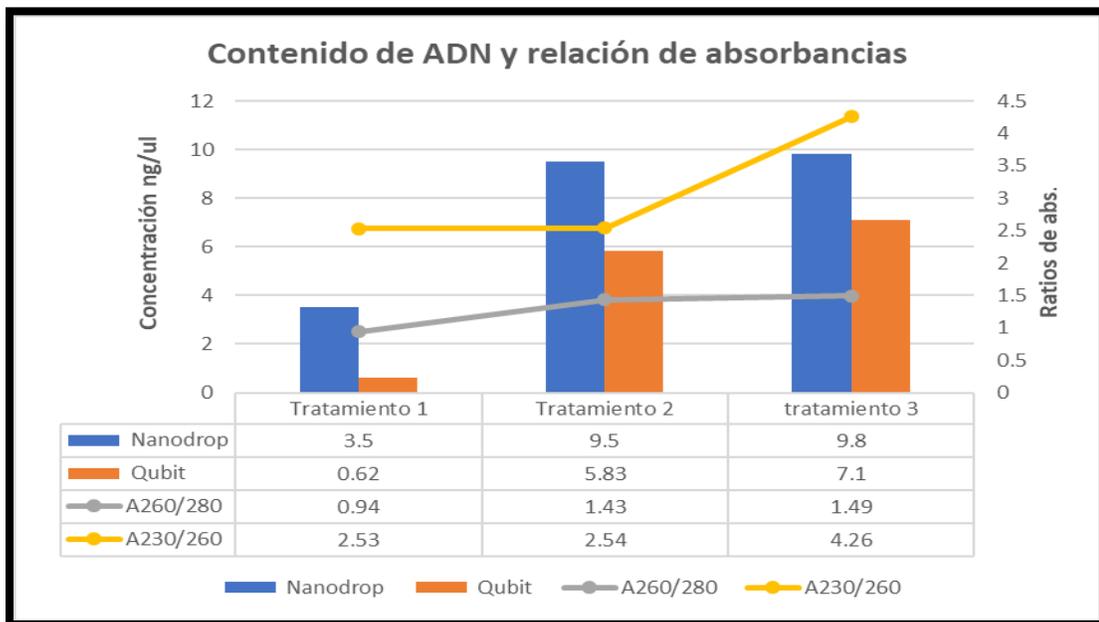


Figura 14. Gráfica del contenido de ADN genómico y relación de absorbancias (A260/280 y A260/230) de *Trifolium amabile* para cada uno de los tratamientos.

3.1.7 Extracción de ADN para *Muhlenbergia fastigiata*

Para *Muhlenbergia fastigiata* se evaluaron 3 protocolos de extracción de ADN donde no se encontró una diferencia estadística en la concentración del ADN (Tabla 11), y los rendimientos fueron bajos como se muestra en la (Figura 15), en comparación con las demás especies vegetales estudiadas del mismo género, sin

embargo, estos resultados presentan concentraciones parecidas a las obtenidas por laboratorio Invitrogen (Tabla 2).

Tabla 11. Comparación de medias de la concentración de ADN de los 3 protocolos para Muhlenbergia fastigiata.

<i>Muhlenbergia fastigiata</i>	Nanodrop	Qubit
	Media (ng/ul)	Media (ng/ul)
Protocolo 1	2.3	1.4
Protocolo 2	2.87	1.91
Protocolo 3	1.5	1.44

Para la calidad del ADN extraído, en los ratios de calidad A260/280 no hubo una diferencia significativa, presentando pureza (Figura 15).

En los ratios de calidad A260/230 no se encontró diferencia significativa, presentando rendimientos bajos lo que indicaría que el ADN esta contaminado con polisacáridos y polifenoles (Loomis, 1974) lo que hace que en plantas pertenecientes a la familia Poaceae sea difícil de realizar una extracción de ADN puro debido a las características fisiológicas de las plantas por su alto contenido de lignina y polisacáridos (Diekmann, et al. 2008), pero estudios realizados en una planta del género Muhlenbergia para estudiar su diversidad genética, se obtuvo un ADN con la calidad necesaria para realizar marcadores moleculares AFLP, usando un método CETAB (CIP, 1997) modificado, aunque el autor ni indica los rendimientos de ADN obtenidos (Garcia, 2010).

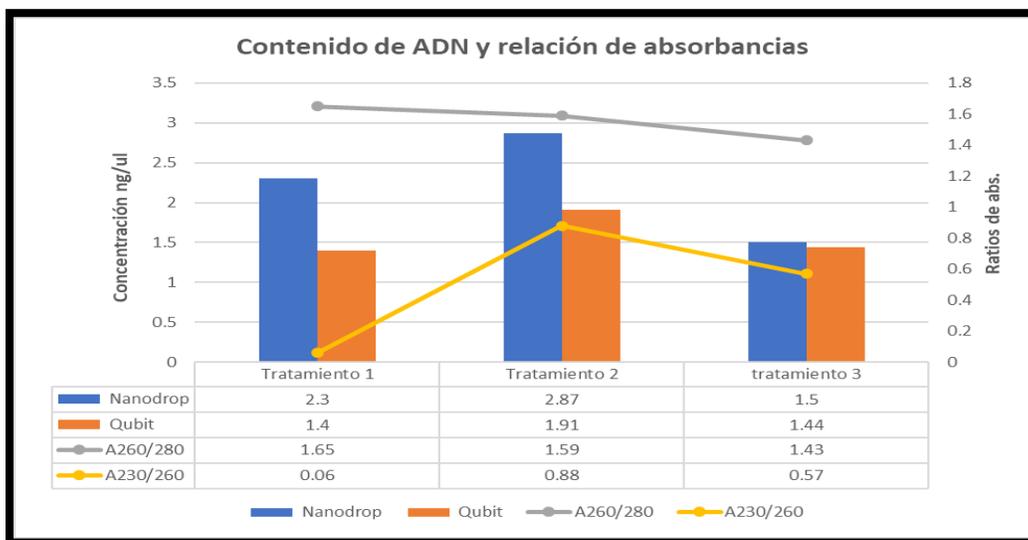


Figura 15. Gráfica del contenido de ADN genómico y relación de absorbancias (A260/280 y A260/230) de *Muhlenbergia fastigiata* para cada uno de los tratamientos.

3.1.8 Extracción de ADN para *Muhlenbergia peruviana*.

Para *Muhlenbergia peruviana* se comparó 3 protocolos de extracción de ADN, donde no se encontró una diferencia significativa para la concentración de ADN (Tabla 12) tanto en lecturas de Nanodrop y Qubit, mostrando rendimientos regulares esto se muestra en la (Figura 16). Y claramente mejores resultados que los obtenidos por el laboratorio invitrogen (Tabla 2), que usando el kit comercial PureLink, obtuvieron resultados para algunas Poaceas (Invitrogen, 2012).

Tabla 12. Comparación de medias de la concentración de ADN de los 3 protocolos para *Muhlenbergia peruviana*.

<i>Muhlenbergia peruviana</i>	Nanodrop	Qubit
	Media (ng/ul)	Media (ng/ul)
Protocolo 1	13.46	7.97
Protocolo 2	10.93	6.46
Protocolo 3	10.13	5.25

Para la calidad y pureza del ADN Extraído en los ratios de Absorbancia A260/280 no se encontró diferencia estadística en los 3 protocolos indicando que el ADN no está contaminado con fenoles ni metabolitos secundarios, y en los ratios A260/230 no se encontró diferencia significativa para los 3 tratamientos teniendo bajos rendimientos lo que indica que el ADN tiene contaminación de polisacáridos (figura 16). Trabajos realizados en una planta del género *Muhlenbergia* para estudiar su diversidad genética, se obtuvo un ADN con la calidad necesaria para realizar marcadores moleculares AFLP, usando un método CETAB (CIP, 1997) modificado, aunque el autor no indica los rendimientos de ADN obtenidos (García, 2010).

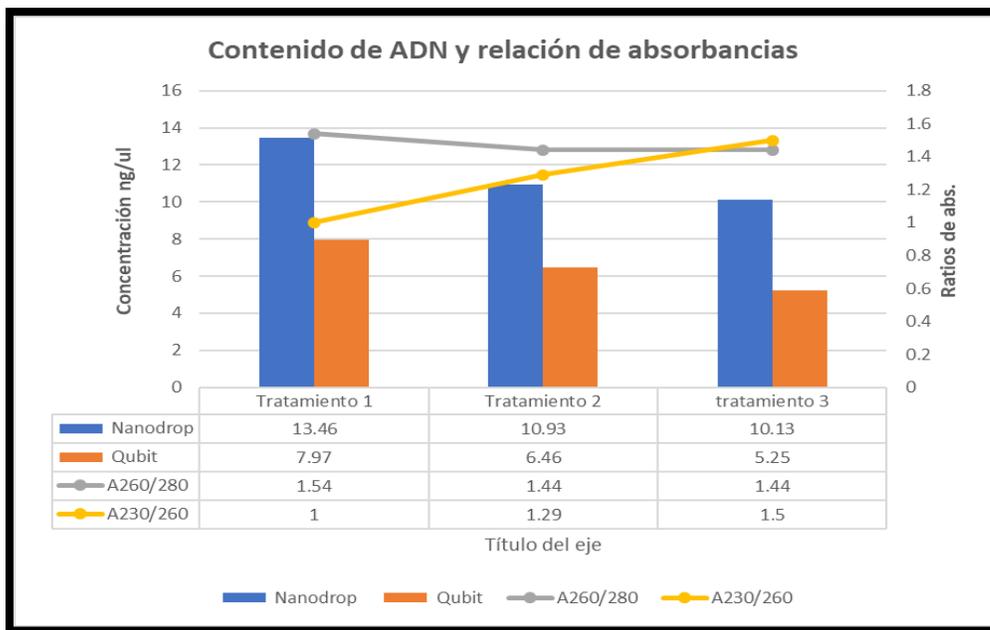


Figura 16. Gráfica del contenido de ADN genómico y relación de absorbancias (A260/280 y A260/230) de *Muhlenbergia peruviana* para cada uno de los tratamientos.

3.1.9 Extracción de ADN para *Paspalum pygmaeum*.

Para *Paspalum pygmaeum* se evaluó 3 protocolos para purificar ADN total donde la lectura de Nanodrop en lo que respecta a la concentración (ul/ng) se encontró

diferencia significativa, siendo los tratamientos 2 y 3 superiores al 1 (Tabla 13). En las lecturas del Qubit no se encontró diferencia significativa para ninguno de los tres protocolos en lo que respecta a la concentración.

Tabla 13. Comparación de medias de la concentración de ADN de los 3 protocolos para *Paspalum pygmaeum*.

<i>Paspalum pygmaeum</i>	Nanodrop		Qubit	
	Media (ng/ul)	Separación de medias	Media (ng/ul)	Separación de medias
Tratamiento 3	51.03	a	5.79	a
Tratamiento 2	26.93	Ab	2.79	a
Tratamiento 1	6.03	b	2.63	a

Para la pureza del ADN se encontró que los protocolos 2 y 3 presentaron una diferencia estadística en los ratios de Absorbancia A260/280, donde se encontraron ratios mayores a 2.0, lo que indica degradación del ADN, esto hace que a mayor fragmentación del ADN más bases nitrogenadas absorben la luz ultravioleta haciendo una sobreestimación de la concentración del ADN (Porebski, et al. 1997), esto sería la causa de la cual los resultados en Nanodrop marcaron esos resultados tan altos, mientras que en los ratios de absorbancia A260/230 no se encontró diferencias significativas siendo el protocolo 2 y 3 los que presentan mayores rendimientos (Figura 17), pero la lectura de estos ratios son superiores a 2.2 lo que podría ser resultado de realizar una medición sobre el pedestal sucio en el equipo Nanodrop (Matlock 2015).

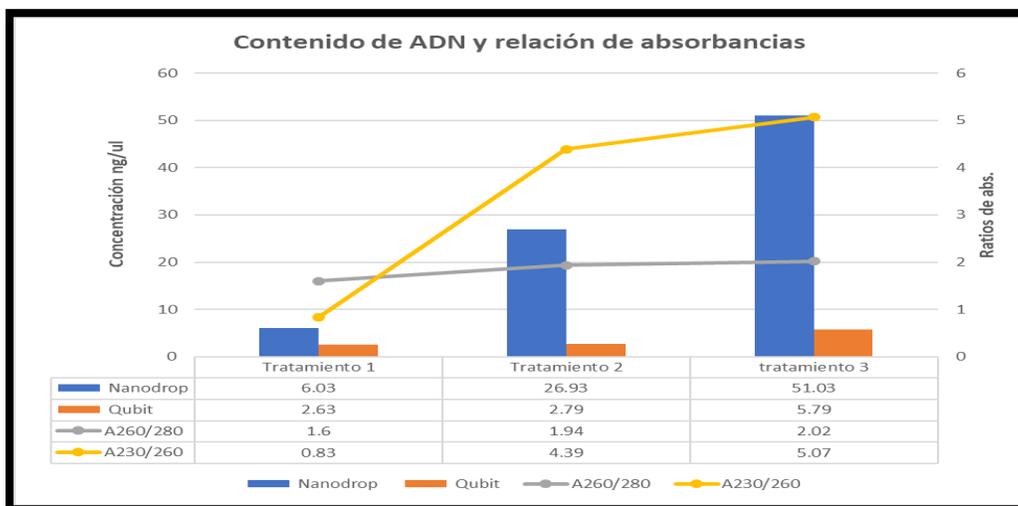


Figura 17. Gráfica del contenido de ADN genómico y relación de absorbancias (A260/280 y A260/230) de *Paspalum pygmaeum* para cada uno de los tratamientos.

3.1.10 Extracción de ADN para *Festuca orthophylla*.

Para *Festuca orthophylla* se evaluaron 3 protocolos para la extracción de ADN donde no se encontró diferencia estadística en lo que corresponde a la concentración del ADN teniendo rendimientos similares en lecturas de Nanodrop y Qubit (Tabla 14).

Tabla 14. Comparación de medias de la concentración de ADN de los 3 protocolos para *Festuca orthophylla*.

<i>Festuca orthophylla</i>	Nanodrop	Qubit
	Media (ng/ul)	Media (ng/ul)
Protocolo 1	8.1	5.32
Protocolo 2	10.6	7.95
Protocolo 3	8.5	5.77

Para la calidad y pureza de ADN purificado no se encontró diferencia estadística en los ratios de absorbancia A260/280 donde los resultados están al límite de ser considerados puro, y en los ratios A260/230 el protocolo 1 obtuvo los rendimientos deseados (Figura 18).

Se realizó extracción de ADN en el género *Festuca* usando el método CETAB modificado, aunque el autor no indica los rendimientos del ADN obtenido, se logró aplicar marcadores moleculares AFLP, para estudiar su diversidad genética (García, 2010).

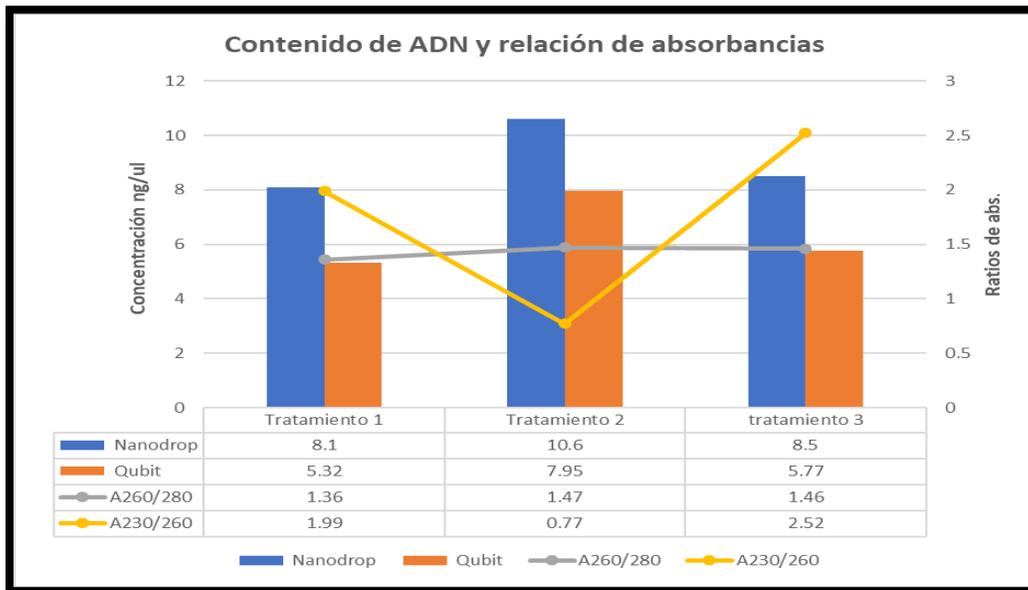


Figura 18. Gráfica del contenido de ADN genómico y relación de absorbancias (A260/280 y A260/230) de *Festuca orthophylla* para cada uno de los tratamientos.

3.1.11 Extracción de ADN para *Calamagrostis vicunarum*.

Para *Calamagrostis vicunarum* se evaluaron 3 protocolos para la extracción de ADN total y para las concentraciones de ADN tanto en lecturas de Nanodrop y Qubit no se encontraron diferencias estadísticas (Tabla 15), teniendo rendimientos regulares (Figura 19).

Tabla 15. Comparación de medias de la concentración de ADN de los 3 protocolos para *Calamagrostis vicunarum*.

<i>Calamagrostis vicunarum</i>	Nanodrop	Qubit
	Media (ng/ul)	Media (ng/ul)
Protocolo 1	2.1	1.05
Protocolo 2	6.1	4.67
Protocolo 3	8.7	6.28

Para la pureza del ADN obtenido de los 3 protocolos no se observó una diferencia significativa en lo que respecta a los ratios de absorbancia A260/280 y A260/230, esto se observa en la (Figura 19).

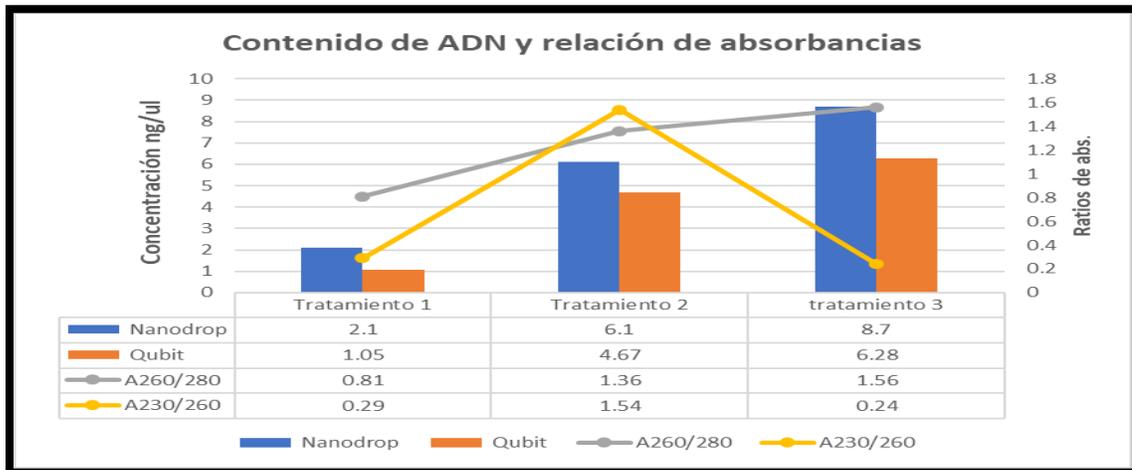


Figura 19. Gráfica del contenido de ADN genómico y relación de absorbancias (A260/280 y A260/230) de *Calamagrostis vicunarum* para cada uno de los tratamientos.

3.1.12 Extracción de ADN para *Poa candamoana*.

Para *Poa candamoana* se evaluaron 3 protocolos para la extracción de ADN total y para las concentraciones de ADN tanto en lecturas de Nanodrop no se encontraron diferencias significativas, y en las lecturas de Qubit se presentó diferencias significativas siendo el protocolo 2 superior al protocolo 1 y 3 (Tabla

16), siendo el protocolo 2 y 3 los que obtuvieron mejores rendimientos en comparación con el protocolo 1 (Figura 20).

Tabla 16. Comparación de medias de la concentración de ADN de los 3 protocolos para *Poa candamoana*.

<i>Poa candamoana</i>	Nanodrop		Qubit	
	Media (ng/ul)	Separación de medias	Media (ng/ul)	Separación de medias
Protocolo 2	8.87	A	8.91	a
Protocolo 3	7.77	a	6.28	ab
Protocolo 1	2.2	a	1.55	b

Para la pureza del ADN obtenido de los 3 protocolos no se observó una diferencia significativa en lo que respecta a los ratios de absorbancia A260/280 y A260/230 (Figura 20).

Se realizó extracción de ADN en el género *Poa* usando el método CETAB modificado, aunque el autor no indica los rendimientos del ADN obtenido, se logró aplicar marcadores moleculares AFLP, para estudiar su diversidad genética (García, 2010)

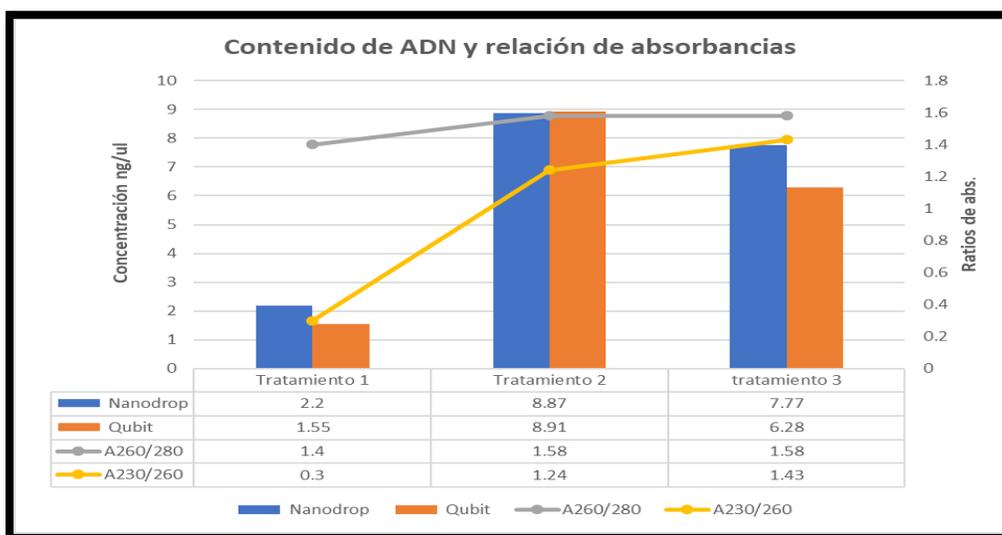


Figura 20. Gráfica del contenido de ADN genómico y relación de absorbancias (A260/280 y A260/230) de *Poa candamoana* para cada uno de los tratamientos.

3.1.13 Extracción de ADN para *Bromus sp.*

Para *Bromus sp* evaluaron 3 protocolos de extracción de ADN total, donde no se encontró una diferencia estadística en lo que respecta a la concentración (Tabla 17), teniendo rendimientos regulares.

Tabla 17. Comparación de medias de la concentración de ADN de los 3 protocolos para *Bromus sp.*

<i>Bromus sp</i>	Nanodrop	Qubit
	Media (ng/ul)	Media (ng/ul)
Protocolo 1	14.73	10.1
Protocolo 2	16.97	11.31
Protocolo 3	18.33	13.87

Para la pureza del ADN extraído no se presentó diferencias estadísticas para los ratios de absorbancia A260/280 y A260/30, esto se puede observar en la (Figura 21).

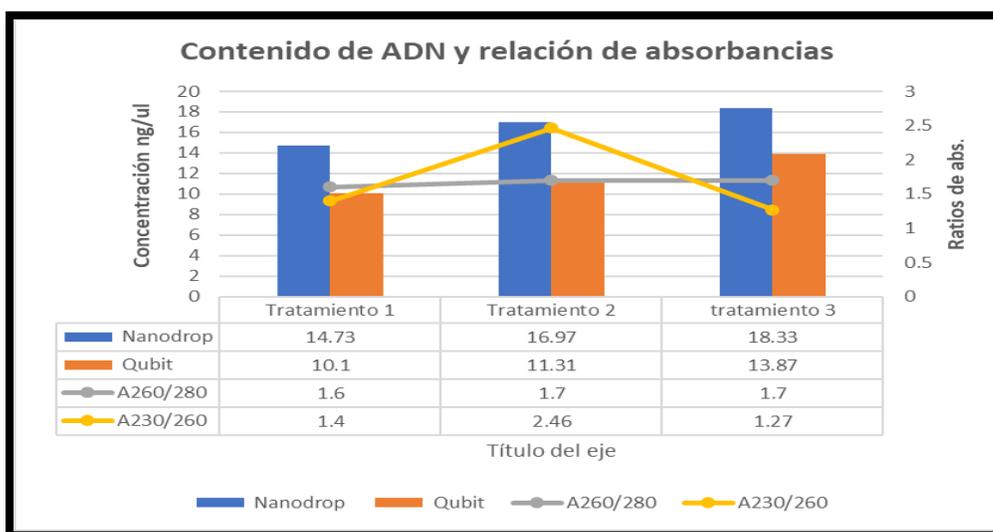


Figura 21. Gráfica del contenido de ADN genómico y relación de absorbancias (A260/280 y A260/230) de *Bromus sp* para cada uno de los tratamientos.

3.2 Determinación de la integridad del ADN por electroforesis en gel de agarosa

Una vez conocida la cantidad y calidad del ADN por espectrofotometría o fluorometría, es importante saber si el ADN está íntegro (Alejos *et al*, 2005), para esto se hace la técnica de electroforesis en gel de agarosa.

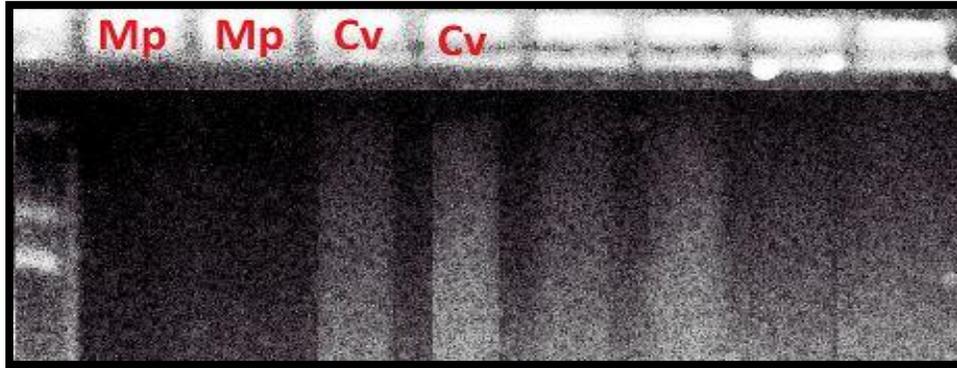


Figura 22. Placa del gel de agarosa 1.

En la figura 22 se observa en el carril 1 el marcador de peso molecular (Lader), en el carril 2 y 3 se observa muestras de ADN de *Margiricarpus pinnatus*, donde no se observó que el ADN corra, en el carril 4 y 5 se observa ADN de *Calamagrostis vicunarum* con fragmentación.

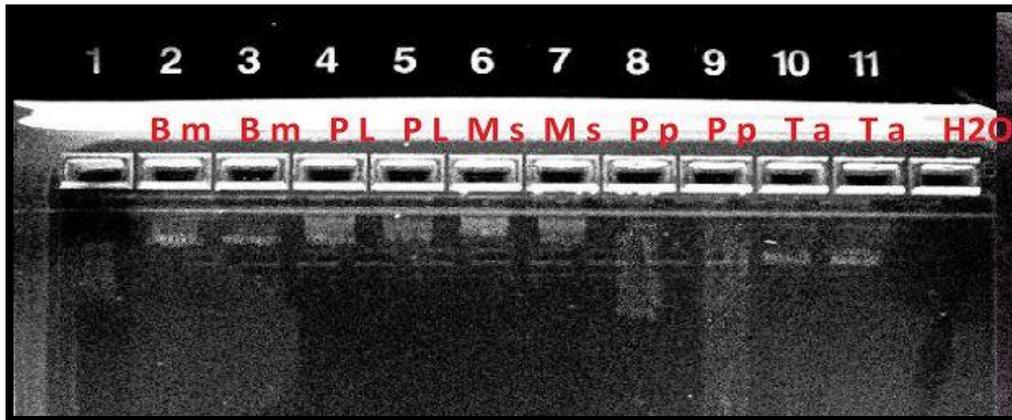


Figura 23. Placa del gel de agarosa 2.

En la figura 23 en los carriles 2 y 3 se observa muestras integras de ADN de *Baccharis microphylla*, en los carriles 4 y 5 se observa muestras integras de ADN de *Parastrephia lepidophylla*, en los carriles 6 y 7 se observa muestras integras de *Margiricarpus strictus*, en los carriles 8 se observa poca fragmentación y en el 9 una

fragmentación completa de muestras de *Paspalum pygmaeum*, y en los carriles 10 y 11 se observa muestras poco fragmentadas de *Trifolium amabile*.

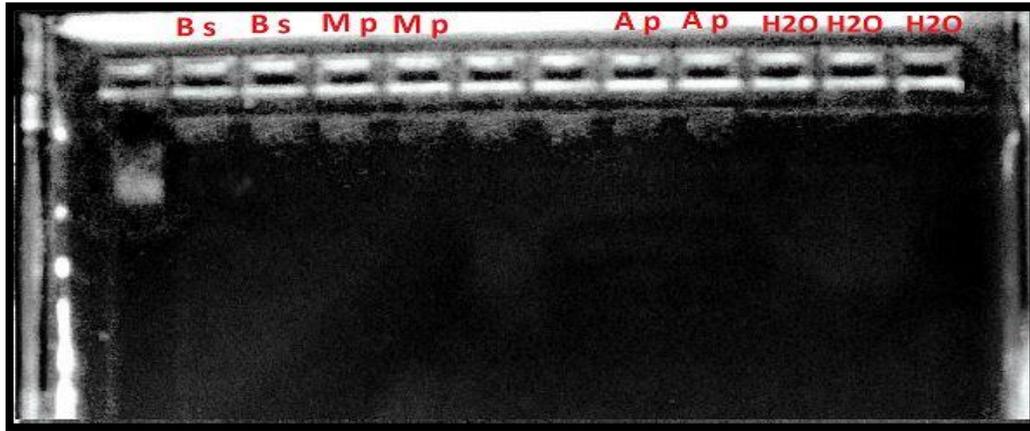


Figura 24. Placa del gel de agarosa 3

En la figura 24 en los carriles 2 y 3 se observa muestras integras de ADN de *Bromus sp*, en los carriles 4 y 5 se observa muestras integras de ADN de *Margyricarpus pinnatus*, en los carriles, en los carriles 8 y 9 se observa poca fragmentación de muestras *Alchemilla pinnata*.

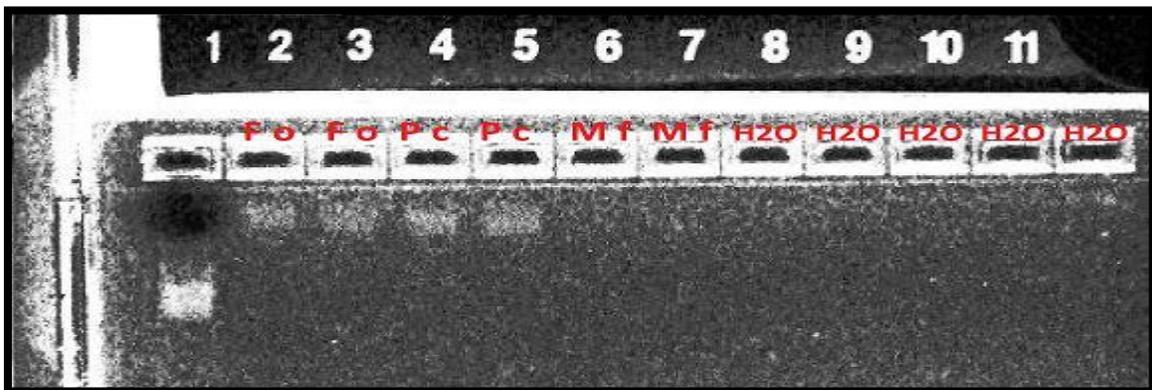


Figura 25. Placa del gel de agarosa 4.

En la figura 25 en los carriles 2 y 3 se observa muestras integras de ADN de *Festuca orthophylla*, en los carriles 4 y 5 se observa muestras integras de ADN de *Poa orthophylla*.

candamoana en los carriles 6 y 7 no se observa corrida en el gel de agarosa de *Muhlenbergia fastigiada*.



Figura 26. E-Gel™ PowerBase™, para la técnica de electroforesis.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

CONCLUSIONES

- Los protocolos P2 (kit de extracción de ADN más lisador celular, 1 ciclo, 110 segundos), y P3 (kit de extracción de ADN más lisador celular, 4 ciclos, 60 segundos) mostraron mejores rendimientos en cantidad y pureza del ADN, en las especies vegetales *Trifolium amabile*, *Paspalum pygmaeum* y *Poa candamoana*.
- Se obtuvo un ADN integro en *Baccharis microphylla*, *Parastrephia lepidophylla*, *Margyricarpus strictus*, *Bromus sp*, *Margyricarpus pinnatus*, *Alchemilla pinnata*, *Festuca orthophylla* y *Poa candamoana*.
- La extracción de ADN a partir de los tres protocolos de total permitió la purificación de ácidos nucleicos, logrando buenos rendimientos de ADN en cantidad, pureza e integridad dependiendo de especie vegetal. Este ADN es adecuado para posteriores análisis moleculares

RECOMENDACIONES

- Establecer y estudiar otros protocolos de extracción de ADN comerciales y no comerciales para todas las especies vegetales que conforman los pastizales altoandinos comparando otros parámetros como: extracción de ADN diferentes órganos botánicos de la planta (raíz, tallo, hoja, meristemos, etc), comparar temperaturas y tiempos de congelación para almacenar la muestra vegetal, etc.
- Una vez extraído el ADN de la especie vegetal deseada, es de vital importancia hacer uso de las muchas herramientas moleculares que existen con sus diversas aplicaciones, como recomendación de este trabajo, es hacer uso de estas herramientas para generar la conservación genética haciendo uso de marcadores moleculares que permitan determinar los niveles de variación genética dentro de las poblaciones de los pastizales altoandinos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aaron, L., Rieseberg, L., Adams, R., Do, N., Ge-lin, Z. (1990). A Method for Collecting Dried Plant Specimens for DNA and Isozyme Analyses, and the Results of a Field Test in Zinjiang, China. *Annals of the Missouri Botanical Garden* , 77 (4), 859- 863.

Abad, M., Bermejo, P. (2007). Baccharis (Compositae): a review update. *Arkivoc*, 7, pp. 76-96.

Abastos, F. (1993). Composición Química y Digestiva de Forrajes Nativos en Llamas y Ovinos en el Altiplano Desértico. Tesis Ing. Agr. Cochabamba, BO, Universidad Mayor de San Simón. 85 p.

Alagón, R., y Rosas, M. (2008). CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE MASHUA (TROPAEOLUM TUBEROSUM) DE LAS COMUNIDADES CAMPESINAS DE CUSCO Y HUANUCO, MEDIANTE MARCADORES AFLPS. Tesis para optar por el título de Ingeniero Biotecnólogo. Biblioteca de la Universidad Católica de Santa María .

Alejos, V., Aragón, M., Cornejo, R. (2015). Extracción y purificación de ADN. 1ra edición Ebook inec Mexico D.F.

Alvarenga, S., Ferreira, M., Emerenciano, V., Cabrol-Bass, D. (2001). Chemo systematic studies of natural compounds isolated from Asteraceae: Characterization of tribes by principal component analysis. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 56: 27-37.

Argote, G., Aguirre, L., Flores E. (2013). Frecuencia de *Trifolium amabile* Kunth (fabaceae) en dos sitios del altiplano de Puno, Perú.

Alzerreca, A., Laura, J., Prieto G. (2002). Estudio de la tola y su capacidad de soporte para ovinos y camélidos en el ámbito boliviano del sistema TDSP. La Paz – Bolivia.

Alzérreca, A., Calle, P., Laura, C. (2002). Manual del manejo y uso sostenible del tolar y los tolares.

Ayaz, F. y Hayirlioglu, A. (2001). Total phenols and condensed tanins in the leaves of some Alchemilla species. *Biología Bratislava* 56 (4): 449-453.

Bedunah, D. J., and Angerer, J. P. (2012). Rangeland degradation, poverty, and conflict: how can rangeland scientists contribute to effective responses and solutions?. *Rangeland Ecology & Management*, 65(6), 606-612.

Beck, S., Domic, A., Garcia, C., Meneses, R. I., Yager, K., Y Halloy, S. (2010). El parque nacional Sajama y sus plantas. Fundación PUMA/SERNAP. Oruro, Bolivia. 250 p.

Boiteux, L. S., Fonseca, M., & Simon, P. W. (1999). Effects of Plant Tissue and DNA Purification Method Randomly Amplified Polimorphic DNA-based Genetic Fingerprinting Analysis in Carrot. *American Society of Horticulture Science*, 124, 32-38.

Brian, Matlock. (2015). Assessment of Nucleic Acid Purity de Thermo Fisher Scientific, Wilmington, MA, USA

Brown, C.G., Waldron, S. A., y Longworth, J. W. (2008). Sustainable Development in Western China: Managing People, Livestock and Grasslands in Pastoral Areas. Edward Elgar, Cheltenham, UK and North hampton, Massachusetts, 294 p.

Castañeda, V., Condori, P. (2010). Catálogo y estudio farmacognóstico de plantas medicinales del distrito de Llacanora, provincia de Cajamarca, departamento de Cajamarca, tesis de grado.

Centro Internacional de la Papa. (1998). *Protocolos de Laboratorio de Biología Molecular.* Lima-Perú.

Chaquilla, O. (1969). Leguminosas del altiplano peruano. Tesis Ing. Agron. UNTA-Puno.

Civjan, N. (2012). Natural Products in Chemical Biology. John Wiley & Sons

Collins, G.G., And Symons, R.H. (1992). Extraction of nuclear DNA from grape vine leaves by a modified procedure. *Plant Mol. Biol. Rept.* 10:233-235 pp.

CONATURA. (2004). Manual de gestión ambiental de la vicuña. Asociación para la investigación y conservación de la naturaleza. Arequipa, Perú.

Costas, M. A. (1979). Embryogeny of *Cortaderia selloana* and *C. jubata* (Gramineae).

Cronquist, A. (1981). An integrated system of classification of flowering plants. Columbia University Press, Nueva York. U.S.A.

De León, M. (2004). Manejo de pastizales naturales, informe técnico N° 2 Proyecto Ganadero Regional, INTA. Manfredi, Argentina.

De La Cruz, H. (2007). Uso tradicional (Medicinal y biosida) de las especies vegetales silvestres de la Cuenca del Río Chillón, Canta-Lima. UNA-La Molina. Tesis Ph.D. Lima-Perú.

Dellaporta, S. L., Wood, J., Hicks, J.B. (1983): A Plant DNA mini preparation: Version II. *Plant Molecular Biology Reporter* 1: 19-21.

Doyle J., and Doyle, J. (1990). A rapid DNA isolation procedure for small

quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull* 19:11-15.

Dundass N., Leos, N., Mitui, M., Revell, P., Rogers, B. (2008). Comparison of automated nucleic acid extraction methods with manual extraction. *Journal of Molecular Diagnostics* 10: 311-316.

Diekmann, k., T. Hodkinson., E. Friecke., S. Barth. (2008). An optimized chloroplast DNA extraction protocol for grasses (Poaceae) proves suitable for whole plastid genome sequencing and SNP detection.

Ferreira, M. E., y Grattapaglia, D. (1998). *Introducción al uso de marcadores moleculares en el análisis genético* (1ra Ed. ed.). Brasilia, Brasil: Ministerio de Agricultura y del Abastecimiento (MA), Empresa Brasileña de Pesquisa Agropecuaria (EMBRAPA) y Centro Nacional de Investigación de Recursos Genéticos y Biotecnología CENARGEN.

Frifelder, D. (1991). *Técnicas de Bioquímica y Biología molecular* (1ra Ed. ed.).

Mexico: Reserve Mexicana.

Flores, E. (1991). *Manejo y Evaluación de Pastizales*. Lima: Fernández B.

Flores, E., Oscanoa, L. (1992). *Avances en la Ecología de la Nutrición de ovinos, alpacas y llamas en el Ecosistema de Puna Seca*. Programa de Ovinos y Camélidos. División de Pastos naturales. Boletín Técnico no.3.

Flores, E. R. (1996). *Reality, Limitations and Research Needs of the Peruvian Livestock Sector*. In *Latin America Livestock Regional Assessment Workshop*: San José, Costa Rica, April 15-18, 1996 (p. 83). IICA

Flores, E.R. (2013). Pastores de Puna, Cambio climático y Seguridad Alimentaria. En conferencia: Pastores de Puna: Vulnerabilidad y Adaptación al Cambio Climático. Laboratorio de Ecología y Utilización de Pastizales – UNALM.

Flores, E.R. (2004). Gestión ambiental y uso racional de la tierra. Lima: Centro de Investigación y Capacitación Campesina, pp. 1-13.

Flores, A. (2005). Manual de pastos y forrajes altoandinos. UNALM. Lima, Perú

Flores, E.; Cruz, J. C. y Ñaupari, J. (2005). Utilización de praderas cultivadas en seco y praderas naturales para la producción lechera. Lima: UNA La Molina -INCAGRO.

Gasto, J; Casio, F y Silva, F. (1990). Sistema de Clasificación de Pastizales de Sudamérica. Sistema de Agricultura. Santiago, Facultad de Agronomía. Pontificia Universidad Católica de Chile. 92p.

García, N. A. (2010). Diversidad genética de pastos nativos, mediante AFLP, en ocho zonas altoandinas de Ayacucho y Huancavelica, tesis de grado,

Genin, D., Alzérreca, H. (2006). Campos nativos de pastoreo y producción animal en la puna semiárida y árida andina. Sécheresse 17 (1-2): 265-274.

Glauco, M., Adrián, P., Patricia, S., Luis, A. (2008). Antimicrobial Activity of Three Baccharis Species Used in the Traditional Medicine of Northern Chile

Gliessman, S. (1998). Agroecology: Ecological processes in sustainable agricultura, CR, pp. 167-172.

González-Astorga, J., Vovides, A. P., Octavio, P., Aguirre, D., Nicolalde, F., Iglesias, C. (2006). Genetic diversity and structure of the cycad *Zamia loddigesii* Miq. (Zamiaceae):

implications for evolution and conservation. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 152, 533-544.

Grime, J. P. (1998). Benefits of plant diversity to ecosystems: immediate, filter and founder effects. *Journal of Ecology* 86: 902-910.

Keer, J. T., y Birch, L. (2008). *Essentials Of Nucleic Acid Analysis: A Robust Approach.* RSCPublishing.

Halloy, S. (1995) Conservación e Investigación ex Situ de Recursos Genéticos del Noroeste Argentino en Nueva Zelandia». En: *Investigación, Conservación y Desarrollo en Selvas Subtropicales de Montaña.* Laboratorio de Investigaciones Ecológicas de las Yungas. Tucumán. 247 p.

Haro, J. A. (2007) Intensidad de pastoreo y contenido de taninos, degradabilidad ruminal y digestibilidad in vitro de *Parastrephia lepidophylla* (Wedd) CABRERA tesis de grado de magister.

Hitchcock, A. S. (1927). The grasses of Ecuador, Perú and Bolivia. United States National Herbarium Contributions No 24.

Invitrogen (2012). Guía del usuario Kit de purificación de ADN total PureLink

Kim, C. S., Lee, C. H., Shin, J. Sm, Shung, Y. S., Hyung, N.I. (1997): A simple and rapid method for isolation of high quality genomic DNA from fruit trees and conifers using PVP. *Nucleic Acids Research* 25: 1085-1086.

Luces, Z. (1958). Gramíneas del distrito federal. Publicación del instituto botánico, Caracas, Venezuela.

Loomis, M. D. (1974). Over coming problems of phenolics and quinones in the isolation of plant enzymes and organelles. *Methods Enzymol* 1974;31:528–544.

Matlock, B. (2015) Assessment of Nucleic Acid Purity de Thermo Fisher Scientific, Wilmington, MA, USA

Manning, K. (1991). Isolation of nucleic acids from plants by differential solvent precipitation. *Ann. Biochem*, 195, 45-50

Mario, T. N., Jorge, F. O. (1984). Pastoreo y pastizales de los andes del sur del Perú.

Martínez, E. 2002. Caracterización Morfológica y fitosociológica de las especies de thola en el ámbito de la cuenca Titicaca. Puno, PE, IIPSC QOLLASUYO.

Ministerio del Medio Ambiente (MINAG) (2006). Ministerio de Agricultura Portal Agrario. Disponible en [www .minag .gob.pe](http://www.minag.gob.pe).

Ministerio del Medio Ambiente (MINAG) (2015). Mapa Nacional de Cobertura Vegetal - Memoria descriptiva.

Morales, G., Paredes, A., Sierra, P., Loyola, L. (2008) Antimicrobial Activity of Three *Baccharis* Species Used in the Traditional Medicine of Northern Chile.

MORENO, C. E. 2001. Métodos para medir la biodiversidad. M&T-Manuales y Tesis SEA, Vol. 1. Zaragoza, España. 84 pp.

Morris, G., y Acton, E. (2003). Patent No. 2 236 237. España.

Nesom, G. L. (1993). Synopsis of *Parastrephia* (Asteraceae: Astereae). *Phytologia* 75

Newman, E. I. (2000). Applied ecology y environmental management. Blackwell Science, London, UK.

Paca, F., Paca, R., Palao, A., Canaza, D., Bustinza, H., Vasquez, G.,

Chambilla, R., Chavez, M. (2003). Autoridad Binacional del Lago Titicaca sistema TDPS. Estudio de la t'ola y su capacidad de soporte para ovinos y camélidos en el ámbito peruano del sistema. Instituto de investigación, producción, servicios y capacitación, Puno. pp. 9-55.

Pasquín, A.I., Grosso, L.B., Mangeaud, A.P., Depetris P.J. (2002). Geoquímica de ríos de montaña en las Sierras Pampeanas. I. Vertientes y arroyos de batolito de Achala, provincia de Córdoba, Argentina. Universidad Nacional de Córdoba. Argentina. 4: 437-444.

Porebski, S., Bailey, L.G., Baum, B.R. (1997). Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components. Plant Mol Biol Rep 15, 8–15.

Príncipe, O. (2008). Manual de producción de pastos en sierra. Fortalecimiento de la cadena de leche del Distrito de Cusca, Provincia de Corongo, Ancash, Perú.

Quiroga, A., Correa, R., Watkins, p. (2001). Evaluación de la calidad forrajera otoñal del pasto punilla en el pastizal de neblina de la cuenca de los puestos. Departamento Ambato. Catamarca

Ragone, E. y Arturo, E. (1967). Vegetación y Ganadería en la República Argentina». Colección Científica del I.N.T.A. Volumen V. Buenos Aires. 98-100 p

Recharte, J., Albán, L., Arévalo, R., Flores, E., Huerta, L. y Orellana, M. (2009). Instituciones y acciones en beneficio de comunidades y ecosistemas alto andinos. Lima: El grupo Páramos/Jalcas y Punas del Perú.

Reynel, C. (1988). Plantas para leña en el sur-occidente de Puno. Puno, Ministerio de Agricultura, INTERCOOPERATION, 164.

Rocha, S (2002) Teoría y práctica para la extracción y purificación del ADN de palma de aceite.

Rogers, S. O. (1994). Phylogenetic and taxonomic information from herbarium and mummified DNA. En Adams RP, Miller RP, Golenberg EM,

Ruiz de castilla, M. (2004). Genética y mejoramiento de animales domésticos.

Salvador, Poma Martín. (2002). Manual de pastos nativos. INRENA. Ancash. Huaraz.

Sambrook, J., E. F. Fritsch y T. Maniatis. (1989). Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, EE.UU. 1989; p. 545.

Schlötterer, C. (2004). The evolution of molecular markers –just a matter of fashion?

Störmer, M., K. Kleesiek y J. Dreier. (2007). High-Volume Extraction of Nucleic Acids by Magnetic Bead Technology for Ultrasensitive Detection of Bacteria in Blood Components. Clinical Chemistry 53: 104–110

Stulnig, T. M. y A. Amberger. (1994). Exposing contaminating phenol in nucleic acid preparations. BioTechniques 16: 402-404.

Somma, M. (2012). Análisis de la Presencia de Organismos Genéticamente Modificados en Muestras de Alimentos. Sesión 4°, Extracción y purificación de ADN.

Taboada, M.A. (2013). “estandarización de una técnica de extracción de adn y un sistema de amplificación pcr-ssr para oenothera rosea (chupa sangre), oenothera multicaulis (chupa sangre de puna) y oenothera tetraptera (chupa sangre gigante)”

Tapia, M.E. y Flores, J.A. (1984). Pastoreo y Pastizales de los Andes del Sur del Perú. INIPA. Lima-Perú.

Thermo Fisher Scientific (2016). Video de Youtube: Quantitation: Comparing Qubit fluorometer to the Nanodrop One UV/Vis absorbance. <https://www.youtube.com/watch?v=y7DLoGxg0k0>

Tovar, Oscar. (1988). Manual de identificación de pastos naturales de los andes del sur peruano (gramíneas) Proyecto Alpacas. Puno – Perú.

Valadez M. E., Kahl, G. (2000). Huellas de ADN en genomas de plantas. Mundi Prensa. Universidad Autónoma de Chapingo.

Vargas, D., y Jimenez, P. (1989). Flora y Vegetación de Tisco-Caylloma (Arequipa). Revista Zonas Áridas. (Nro. 6, 1989 – 1990). Arequipa, PE. 85 – 94 p.

Verdi, G., Brighente, C., Pizzolatti, G. (2005). Género Baccharis (Asteraceae): aspectos químicos, económicos e biológicos. Nova [online], 28, 1, pp. 85-94.

Villarpando, D., Villarpando, P., Y Villalobos, J.; La paz (2011). Ficha botánica de especies agroforestales nativas aptas para tierras.

Yaranga, R. (2000). Manejo de Pasturas y Pastizales en los Sistemas de Producción Pecuaria de la Sierra Central. Sistemas de producción y gestión del pastoreo. Departamento Académico de Nutrición Animal. UNCP. Huancayo, Perú.

Zavala Castro, J. E. (2005). Manual de Técnicas Básicas de Biología Molecular (1era Ed. ed.). Yucatán: Merida.

ANEXOS

Anexo 1. Especies recolectadas y su identificación.

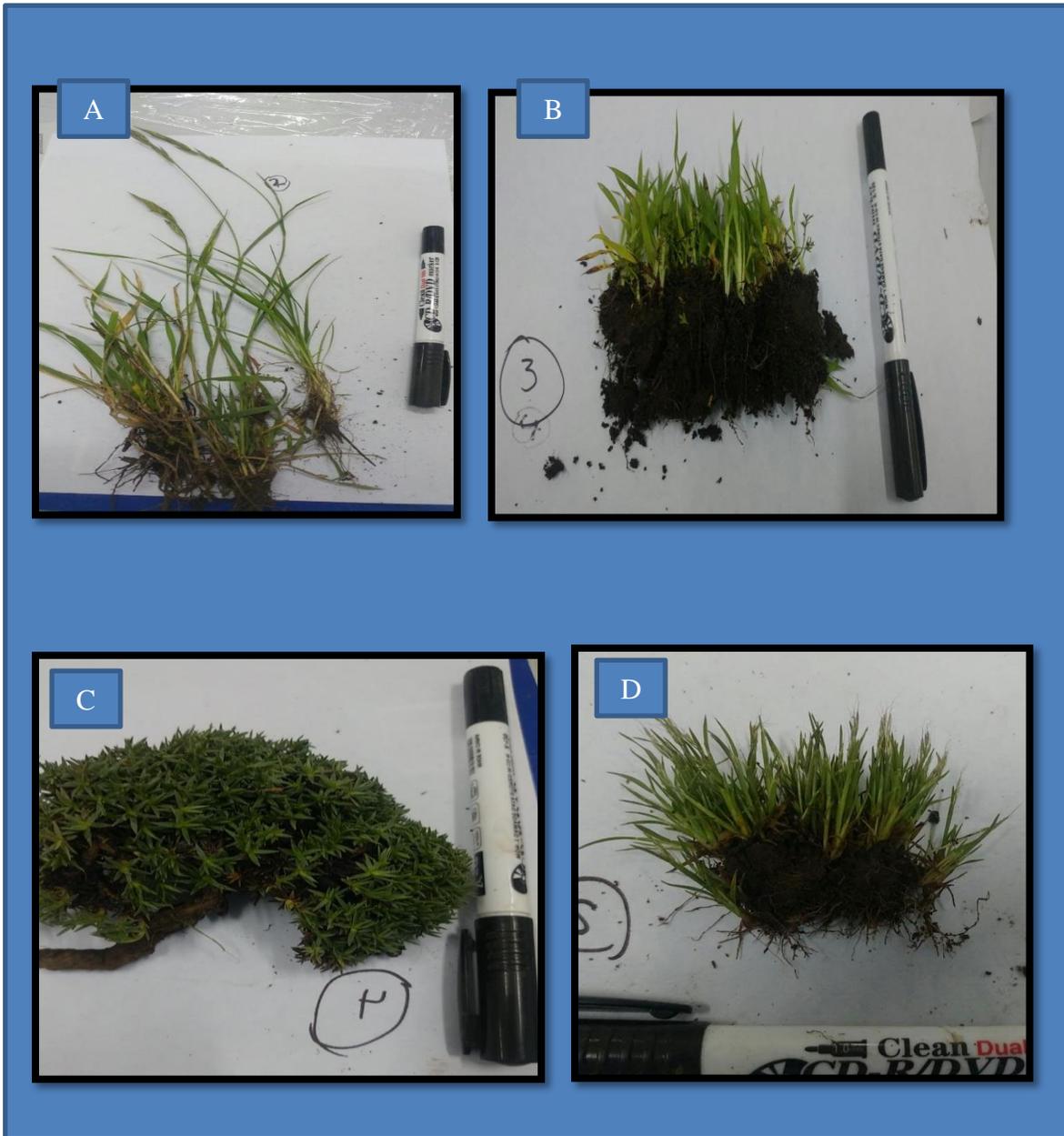


Figura 27. A. *Bromus* sp, B. *Paspalum pygmaeum*, C sp. D. *Muhlebergia peruviana*

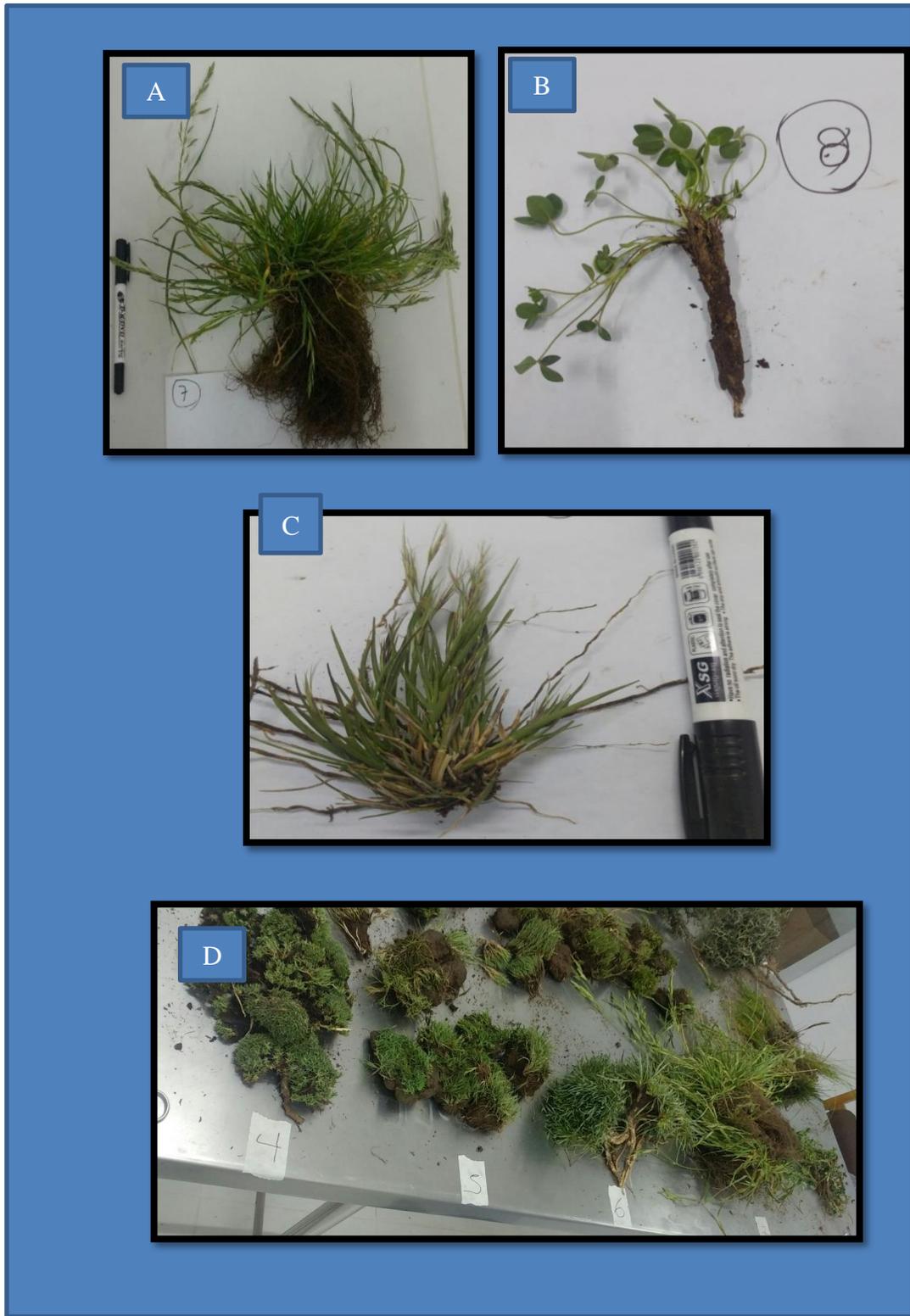


Figura 28. A. *Bromus* sp, B. *Trifolium amabile*, C. identificación de muestras.

ANEXO 2: POSICIÓN TAXONÓMICA DE LAS ESPECIES VEGETALES

Posición taxonómica de las especies

La posición taxonómica de las especies se describió en base al sistema de clasificación APG III (Grupo filogenético de Angiospermas).

CLASE: MAGNOLIOPSIDA

Orden: Asterales

Familia: Asteraceae

Género: *Parastrephia*

Especie: *Parastrephia lepidophylla* (Wedd.) Cabrera

Género: *Baccharis*

Especie: *Baccharis microphylla* (Kunt.) Sinom

CLASE: MONOCOTYLEDONEAE

Orden: Poales

Familia: Poaceae

Género: *Festuca*

Especie: *Festuca orthophylla* (Pilg.)

Género: *Poa*

Especie: *Poa candamoana*

Género: *Calamagrostis*

Especie: *Calamagrostis vivunarun*

Género: *Bromus*

Especie: sp.

Género: *Muhlenbergia*

Especie: *Muhlenbergia peruviana*

Género: *Muhlenbergia*

Especie: *Muhlenbergia fastigiata*

Género: *Paspalum*

Especie: *Paspalum pygmaeum*

CLASE: DICOTYLEDONEAE

Orden: Rosales

Familia: Rosáceas

Género: *Alchemilla*

Especie: *Alchemilla pinnata*

Género: *Margyricarpus*

Especie: *Margyricarpus pinnatus*

Género: *Margyricarpus*

Especie: *Margyricarpus strictus*

CLASE: EUDICOTYLEDONEAE

Orden: Fabales

Familia: Leguminosae

Género: *Trifolium*

Especie: *Trifolium amabile*

ANEXO 3: DESCRIPCIÓN BOTÁNICA DE LAS ESPECIES VEGETALES

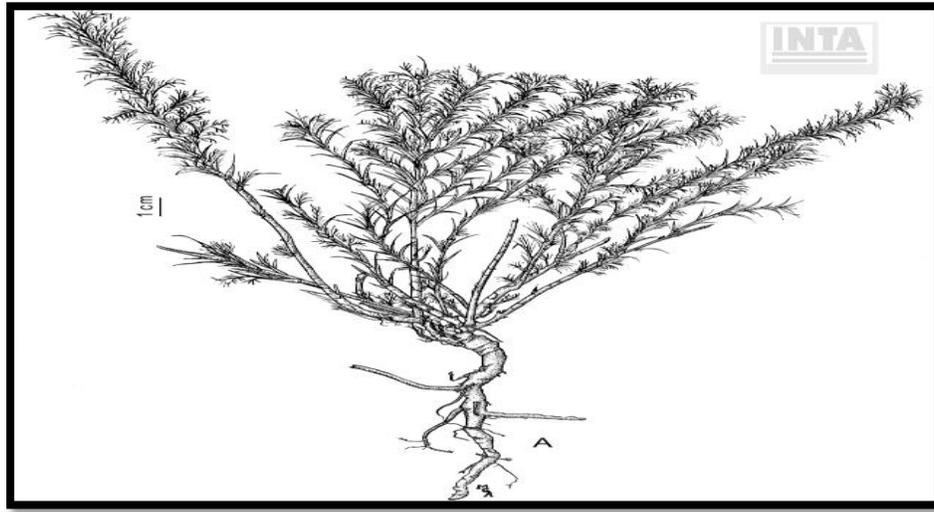


Figura 29. Margyricarpus pinnatus

Fuente: Tapia y Flores (1984)

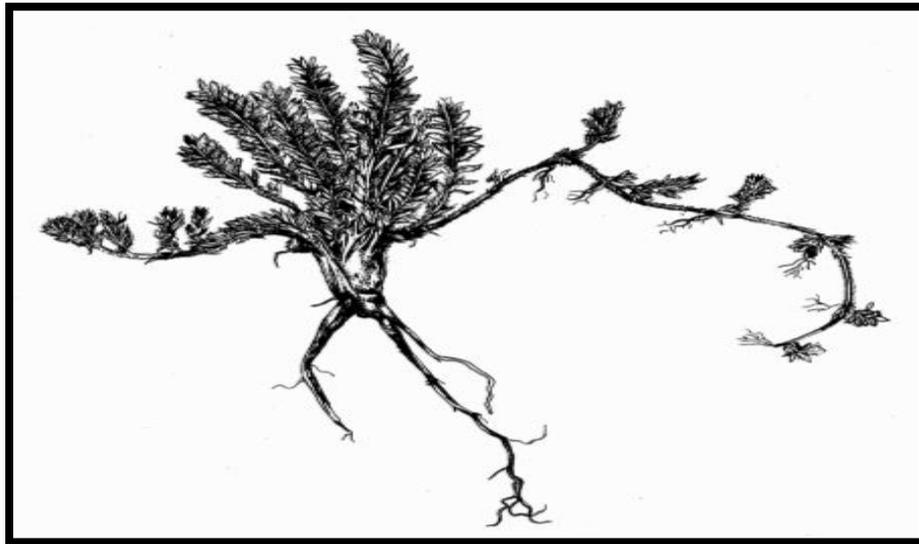


Figura 30. Alchemilla pinnata Ruiz y Pavón. sillo sillo.

Fuente: Tapia y Flores (1984)

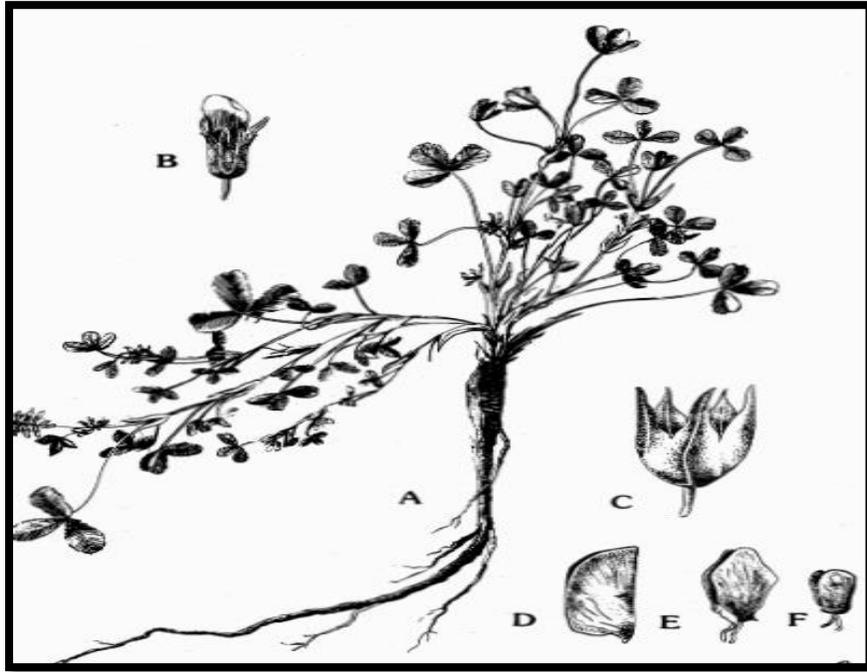


Figura 31. *Trifolium amabile* H.B.K. A, planta; B, flor; C, cáliz; D, E, F, estandartes.

Fuente: Tapia y Flores (1984)



Figura 32. *Muhlenbergia fastigiata* (Presl). A, Planta; B, espiguilla.

Fuente: Tapia y Flores (1984)

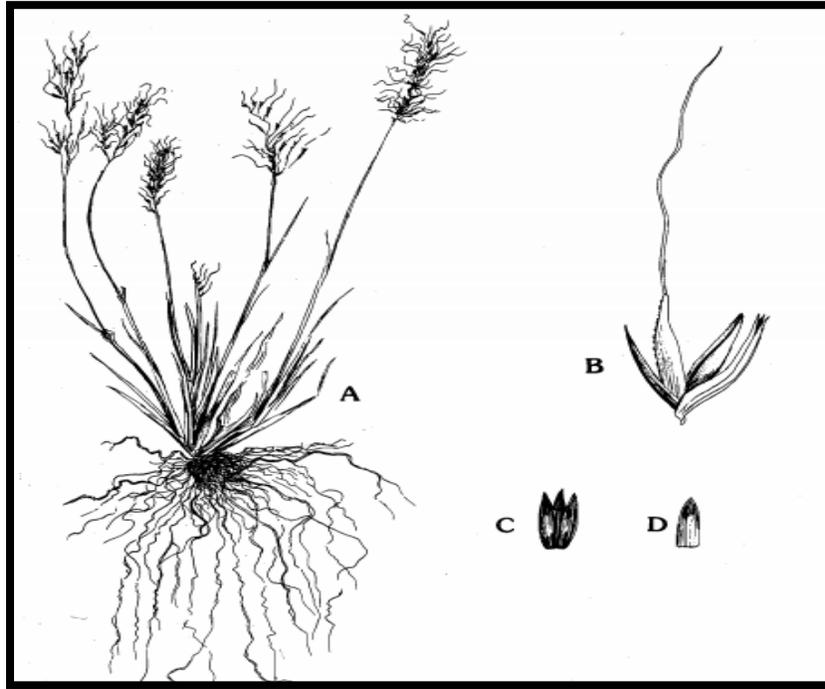


Figura 33. *Muhlenbergia peruviana* (Beauv). A, planta; B, espiguilla; C, glumas externas; D, gluma interna.

Fuente: Tapia y Flores (1984)



Figura 34. *Paspalum pigmaeum* Rack. A, Planta; B, flósculo

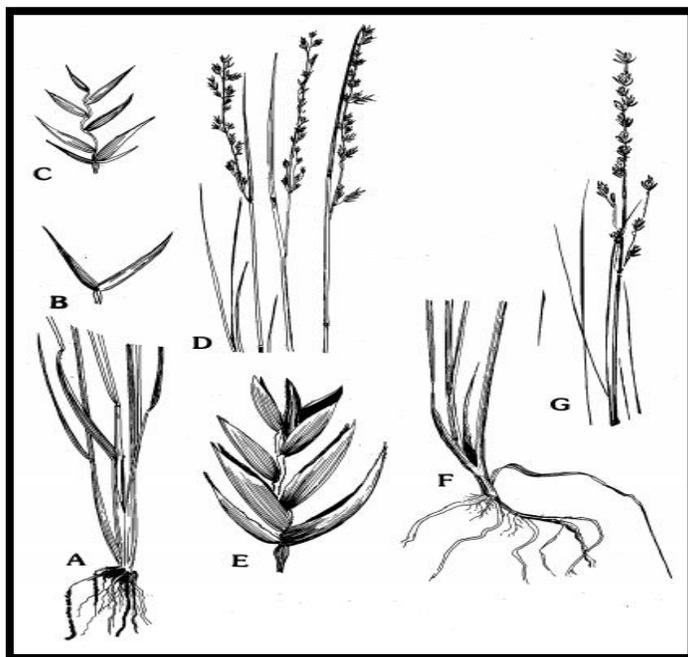


Figura 35. *Festuca dolichophylla* Presl. chilligua A, raíz; B, glumas; C, espiguilla; D, inflorescencia. *Festuca orthopnylla* Pilger. Planta iru ichu E, espiguilla; F, raíz; G, panoja.

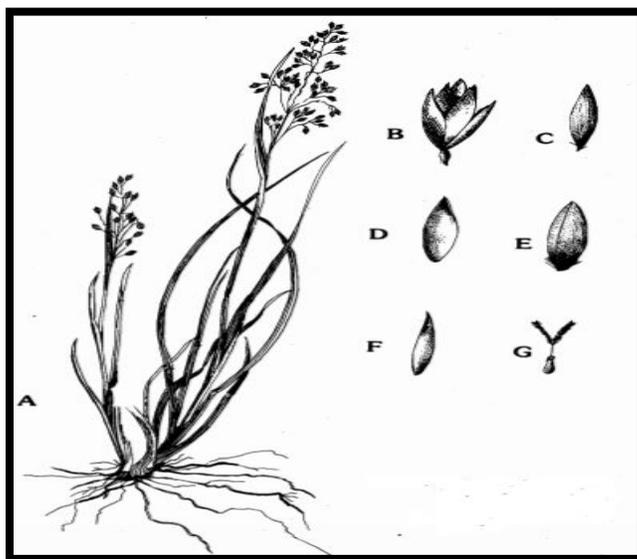


Figura 36. *Poa candamoana* Pilger. A, planta; espiguilla; C, palea; D, gluma inferior; E, lemma; F, gluma superior; G, pistilo

Fuente: Tapia y Flores (1984)

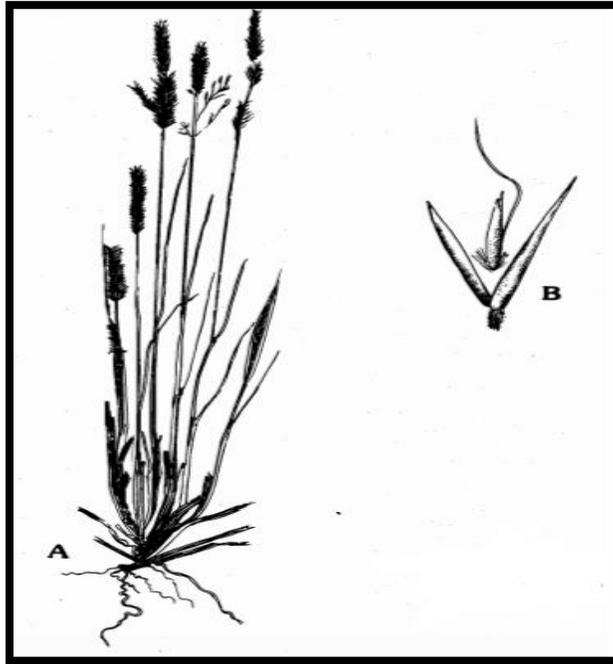


Figura 37. *Calamagrostis vicunarum* (Wedd) Pilger. "crespillo", "ñapapasto": A. planta; B, glumas y flósculo.

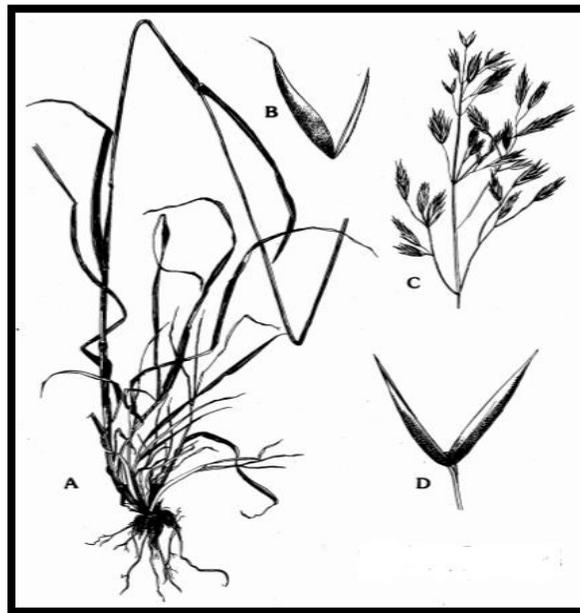


Figura 38. *Bromus* sp.. "cebadilla" A, planta; B, lemma; C, panoja; D, glumas.

Fuente: Tapia y Flores (1984)

ANEXO 3: FLUJOGRAMA DEL PROCESO DE EXTRACCIÓN DE ADN.

Flujograma de los Procesos de Obtención y procesamiento de la muestras, purificación, cuantificación y determinación de la calidad del DNA de las especies vegetales de los tolare

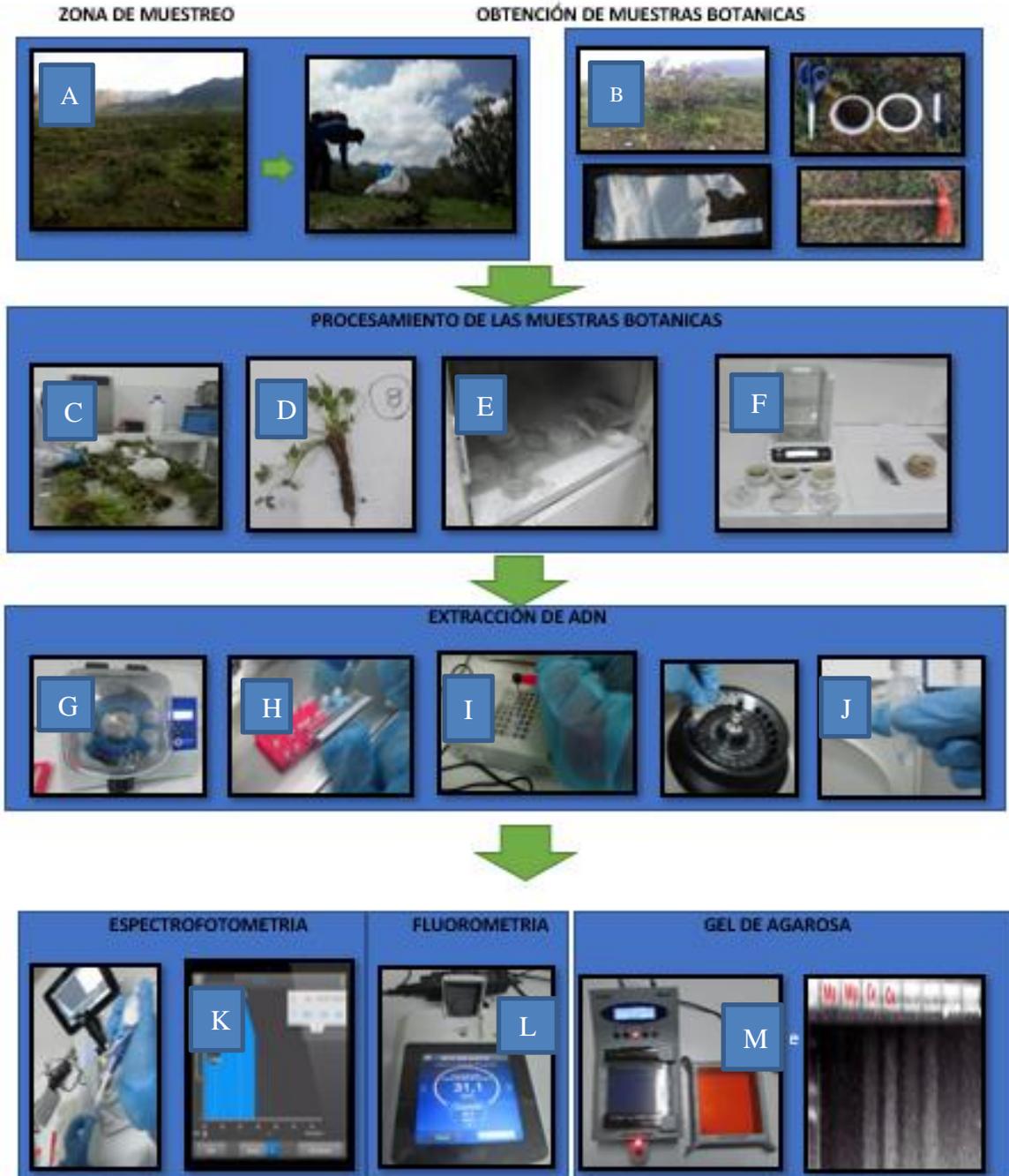


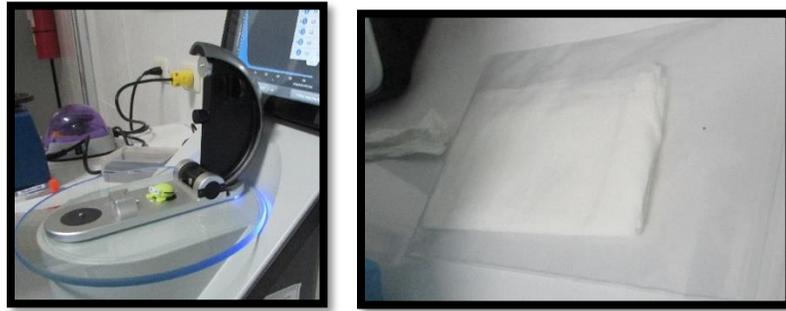
Figura 39. Flujograma de trabajo.

A. muestreo en el Fundo Qena, B. materiales en cambio para la recolección de muestras, C. identificación de las especies, D. *Trifolium amabile*, E. almacenamiento de muestras a - 85°C, F. Pesaje de muestras, G. Homogenización mecánica, H. uso de reactivos, I. uso del termobloque, J. ADN obtenido, K. Software del NanoDrop. L. Qubit, M. técnica de electroforesis en gel de agarosa.

ANEXO 4: PROCEDIMIENTOS DE NANODROP

Procedimiento de uso del Nanodrop

10. Antes de tomar alguna medición con el instrumento, levante el brazo del instrumento y limpie los pedestales superior e inferior con una toallita de laboratorio.



11. En la pantalla de inicio seleccione ADN.



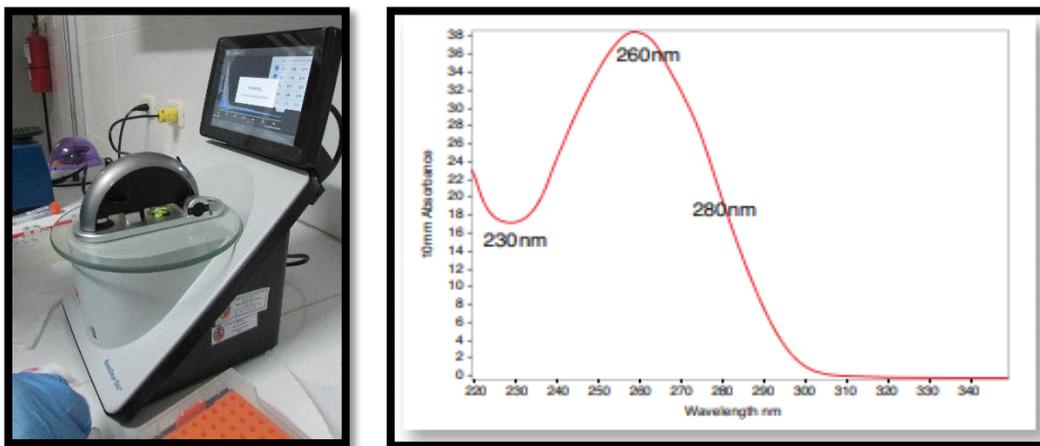
12. Pipetear 1 ul de solución blanco en pedestal inferior y baje el brazo.



13. Toque **Blanco** y espere a que termine la medición.
14. Levante el brazo y limpie ambos pedestales con una toallita
15. Pipetee 1 ul de solución de muestra en el pedestal y baje el brazo.



16. Comience la **Medición** de la muestra.



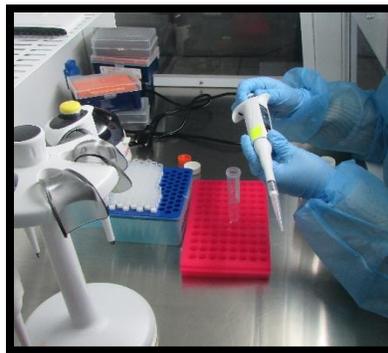
17. Cuando ya terminé la medición de las muestras, toque **Finalizar experimento y exportar**
18. Levante el brazo y limpie ambos pedestales con una toallita.

ANEXO 5: PROCEDIMIENTOS DEL QUBIT

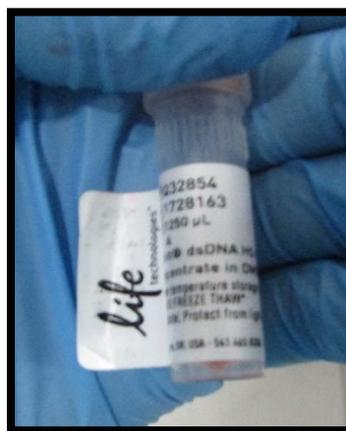
10. estándares.



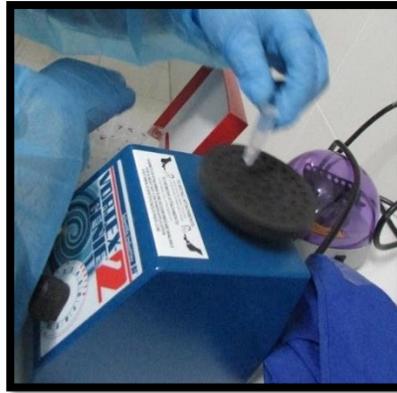
11. Calculando 199 ul de buffer Qubit dsDNS + 1 ul colorante) + 2 volúmenes extras de 199 + 1 ul colorante = volumen total.



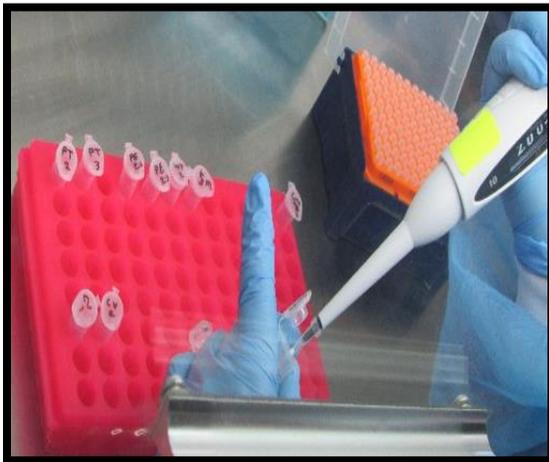
12. Agregar la solución de colorante al final y protegerla de la luz siempre.



13. Homogenizar el colorante en vortex y dalre un espin corto en centrifuga, homogenizar también la solución final en el vortex.



14. Etiquetar un tubo para cada muestra y uno para cada estándar, tomar 198 ul de la solución trabajo para cada muestra en un tubo nuevo y agregarle 2 ul de muestra, homogenizar en vortex.

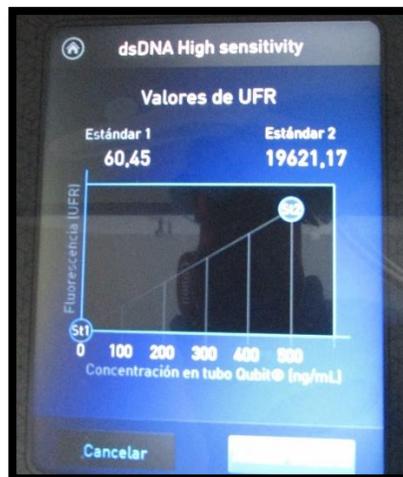


15. El primer menú de opciones que el equipo muestra es el menú de ensayos, si se trata de cuantificar AND presionar sobre la pantalla ADN de doble cadena HS y luego Leer datos.



Foto: Qubit 2.0

16. Antes de leer las muestras se debe calibrar el equipo, para ello se lee la mezcla de los estandares # 1 y 2 con 190 ul de solución de trabajo y con 10 ul de cada estándar (homogeneizar cada estandae en vortex y darle un espín ligero antes de hacer la mezcla)



17. El equipo pide leer el estándar # 1 y 2, los valores de las muestras deben estar en el rango de los valores de la curva de calibración. Se coloca el tubo del estándar en la cavidad de la parte superior, se cierra la cubierta y se presiona en Leer estándar.



18. Se coloca los tubos con la mezcla y se hace la lectura de la concentración del ADN.



Foto: lecturas de Qubit

ANEXO 6: PROCEDIMIENTOS DEL GEL DE AGAROSA

1. Retire el gel de agarosa E-Gel™ del paquete y retire el peine del cassette Inserte el gel en la base, comenzando desde el borde derecho del casete. El logotipo de Invitrogen debe ubicarse en la parte inferior de la base. Presione firmemente en la parte superior e inferior para asentar el gel la base. Una luz roja constante se ilumina en la base si el gel está insertado correctamente

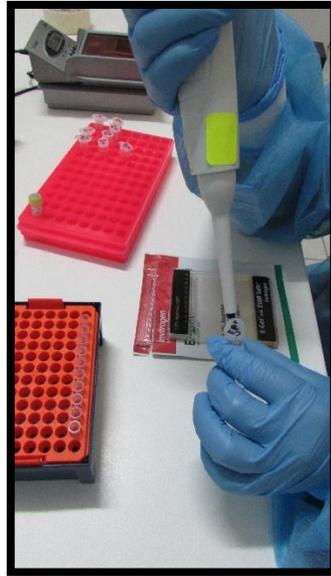


2. Enchufe el E-Gel™ PowerBase™ v.4 en un tomacorriente utilizando el enchufe del adaptador en la base.



3. Cargue 20 µl de muestra preparada en cada pocillo.

4. Cargue 500-700 ng de marcadores de peso molecular de ADN apropiados.
5. Cargue 20 μ l de agua en los pozos vacíos restantes



ANEXO 7: TABLAS RESUMEN DEL EXPERIMENTO

Tabla. Lecturas de Nanodrop y Qubit para los 3 protocolos en *Parastrephia lepidophylla*

<i>Parastrephia lepidophylla</i>	Nanodrop			Qubit	
	ng/ul	A260/280	A260/230	ng/ul	ng/ml
Protocolo 1	24	1.7	1.28	31	310
Protocolo 1	41.6	1.75	0.94	43.4	434
Protocolo 1	25.2	1.7	0.66	25.6	256
Protocolo 2	24.2	1.73	1.01	22.9	229
Protocolo 2	19.5	1.69	0.63	18.4	184
Protocolo 2	28.6	1.72	0.19	31.1	311
Protocolo 3	26.6	1.69	1.98	29.3	293
Protocolo 3	19	1.63	1.5	18.6	186
Protocolo 3	31.3	1.75	1.51	33.3	333

Tabla. Lecturas de Nanodrop y Qubit para los 3 protocolos en *Baccharis microphylla*

<i>Baccharis microphylla</i>	Nanodrop			Qubit	
	ng/ul	A260/280	A260/230	ng/ul	ng/ml
Protocolo 1	20.1	1.72	2.11	17.9	179
Protocolo 1	29.3	1.67	1.12	26.5	265
Protocolo 1	20.7	1.66	1.96	18.7	187
Protocolo 2	19	1.6	0.52	16.7	167
Protocolo 2	13.2	1.5	0.2	9.7	97
Protocolo 2	15.2	1.52	0.94	11.2	112
Protocolo 3	16.6	1.56	1.52	15.2	152
Protocolo 3	14.2	1.5	0.72	11.1	111
Protocolo 3	16.1	1.52	1.32	13.5	135

Tabla. Lecturas de Nanodrop y Qubit para los 3 protocolos en *Margiricarpus strictus*

<i>Margiricarpus strictus</i>	Nanodrop			Qubit	
	ng/ul	A260/280	A260/230	ng/ul	ng/ml
Protocolo 1	25.7	1.76	0.79	26.6	266
Protocolo 1	26.5	1.69	1.1	24.2	242
Protocolo 1	35.6	1.72	2.06	38.1	381
Protocolo 2	22.95	1.73	1.25	22.8	228
Protocolo 2	29.1	1.69	0.6	30.4	304
Protocolo 2	29.1	1.71	0.81	28.5	285
Protocolo 3	31.6	1.7	1.48	31.1	311
Protocolo 3	35.9	1.73	0.98	35.1	351
Protocolo 3	28.2	1.74	1.92	26.7	267

Tabla. Lecturas de Nanodrop y Qubit para los 3 protocolos en *Baccharis microphylla*

<i>Margyricarpus pinnatus</i>	Nanodrop			Qubit	
	ng/ul	A260/280	A260/230	ng/ul	ng/ml
Protocolo 1	1.3	0.99	0.05	0.385	3.85
Protocolo 1	1.3	0.71	0.05	0.939	9.39
Protocolo 1	2	0.91	0.07	0.422	4.22
Protocolo 2	3.6	1.24	0.1	0.489	4.89
Protocolo 2	1.2	1.08	0.42	0.467	4.67
Protocolo 2	1.1	1.08	0.06	1.36	13.6
Protocolo 3	1.5	1.14	0.1	1.05	10.5
Protocolo 3	2.6	1.42	0.03	1.36	13.6

Tabla. Lecturas de Nanodrop y Qubit para los 3 protocolos en *Alchemilla pinnata*.

<i>Alchemilla</i> <i>pinnata</i>	Nanodrop			Qubit	
	ng/ul	A260/280	A260/230	ng/ul	ng/ml
Protocolo 1	3.1	1.33	0.39	1.81	18.1
Protocolo 2	8.8	1.45	1.02	4.49	44.9
Protocolo 2	13.6	1.46	0.12	5.73	57.3
Protocolo 2	5.2	1.22	0.34	2.2	22
Protocolo 3	7.1	1.45	1.02	2.53	25.3
Protocolo 3	6.2	1.26	1.02	2.72	27.2
Protocolo 3	4.1	1.08	0.61	1.26	12.6

Tabla. Lecturas de Nanodrop y Qubit para los 3 protocolos en *Festuca orthophylla*.

<i>Festuca</i> <i>orthophylla</i>	Nanodrop			Qubit	
	ng/ul	A260/280	A260/230	ng/ul	ng/ml
Protocolo 1	8.1	1.36	1.99	5.32	53.2
Protocolo 1	14	1.57	0.83	10.8	108
Protocolo 1	10.9	1.5	0.92	8.22	82.2
Protocolo 2	6.9	1.33	0.57	4.83	48.3
Protocolo 2	6.6	1.44	1.84	4.83	48.3
Protocolo 2	8.3	1.34	1.81	4.07	40.7
Protocolo 3	10.7	1.59	3.91	8.43	84.3

Tabla. Lecturas de Nanodrop y Qubit para los 3 protocolos en *Poa candamoana*.

<i>Poa candamoana</i>	<i>Nanodrop</i>			<i>Qubit</i>	
	<i>ng/ul</i>	<i>A260/280</i>	<i>A260/230</i>	<i>ng/ul</i>	<i>ng/ml</i>
Protocolo 1	2.2	1.4	0.3	1.55	15.5
Protocolo 1	9.7	1.68	1.26	8.07	80.7
Protocolo 1	11.5	1.66	1.02	8.81	88.1
Protocolo 2	5.7	1.4	1.45	9.84	98.4
Protocolo 2	9.1	1.57	1.54	6.73	67.3
Protocolo 2	8.1	1.65	1.62	7.22	72.2
Protocolo 3	6.1	1.51	1.12	4.89	48.9

Tabla. Lecturas de Nanodrop y Qubit para los 3 protocolos en *Calamagrostis vicunarun*.

<i>Calamagrostis vicunarun</i>	<i>Nanodrop</i>			<i>Qubit</i>	
	<i>ng/ul</i>	<i>A260/280</i>	<i>A260/230</i>	<i>ng/ul</i>	<i>ng/ml</i>
Protocolo 1	2.1	0.81	0.29	1.05	10.5
Protocolo 2	2.4	1.28	0.59	2.54	25.4
Protocolo 2	9.8	1.44	2.48	6.79	67.9
Protocolo 3	10.6	1.69	0.08	7.59	75.9
Protocolo 3	6.8	1.44	0.39	4.97	49.7

Tabla. Lecturas de Nanodrop y Qubit para los 3 protocolos en *Bromus sp.*

<i>Bromus sp</i>	Nanodrop			Qubit	
	ng/ul	A260/280	A260/230	ng/ul	ng/ml
Protocolo 1	13.6	1.66	2.04	13.9	139
Protocolo 1	11.1	1.69	1.38	9.36	93.6
Protocolo 1	11.9	1.56	0.88	7.04	70.4
Protocolo 2	18	1.68	3.93	12.4	124
Protocolo 2	14.1	1.79	1.72	9.03	90.3
Protocolo 2	18.8	1.63	1.74	12.5	125
Protocolo 3	20.4	1.67	0.62	14.8	148
Protocolo 3	17.5	1.67	1.81	14.2	142
Protocolo 3	17.1	1.71	1.39	12.6	126

Tabla. Lecturas de Nanodrop y Qubit para los 3 protocolos en *Muhlenbergia peruviana*.

<i>Muhlenbergia peruviana</i>	Nanodrop			Qubit	
	ng/ul	A260/280	A260/230	ng/ul	ng/ml
Protocolo 1	14.9	1.55	0.47	9.45	94.5
Protocolo 1	8.7	1.48	0.59	4.37	43.7
Protocolo 1	16.8	1.58	1.94	10.1	101
Protocolo 2	13.9	1.53	1	8.56	85.6
Protocolo 2	8.1	1.32	1.26	4.45	44.5
Protocolo 2	10.8	1.47	1.6	6.38	63.8
Protocolo 3	11.2	1.45	0.99	5.86	58
Protocolo 3	7.5	1.36	1.35	2.62	26.2
Protocolo 3	11.7	1.5	2.17	7.34	73.4

Tabla. Lecturas de Nanodrop y Qubit para los 3 protocolos en *Muhlenbergia fastigiada*.

<i>Muhlenbergia fastigiada</i>	Nanodrop			Qubit	
	ng/ul	A260/280	A260/230	ng/ul	ng/ml
Protocolo 1	2.3	1.59	0.06	1.4	14
Protocolo 2	4	1.9	0.91	2.17	21.7
Protocolo 2	3.1	1.25	1.14	1.91	19.1
Protocolo 2	1.5	1.81	0.59	1.66	16.6
Protocolo 3	1.2	1.14	0.63	1.22	12.2
Protocolo 3	1.9	1.81	0.71	1.62	16.2
Protocolo 3	1.5	1.33	0.39	1.81	18.1

Tabla. Lecturas de Nanodrop y Qubit para los 3 protocolos en *Paspalum pygmaeum*.

<i>Paspalum pygmaeum</i>	Nanodrop			Qubit	
	ng/ul	A260/280	A260/230	ng/ul	ng/ml
Protocolo 1	6.6	1.57	0.62	2.7	27
Protocolo 1	5.9	1.62	0.93	2.19	21.9
Protocolo 1	5.6	1.68	0.93	2.99	29.9
Protocolo 2	44.3	2.03	11.32	4.7	47
Protocolo 2	14.7	1.86	0.93	1.7	17
Protocolo 2	21.8	1.93	-6.8	1.96	19.6
Protocolo 3	62.7	2.08	5.31	7.55	75.5
Protocolo 3	59.5	2.02	4.96	3.66	36.6
Protocolo 3	30.9	1.98	-11.94	6.18	61.8

Tabla. Lecturas de Nanodrop y Qubit para los 3 protocolos en *Trifolium amabile*.

<i>Trifolium</i> <i>amabile</i>	Nanodrop			Qubit	
	ng/ul	A260/280	A260/230	ng/ul	ng/ml
Protocolo 1	3.9	0.95	1.06	0.526	5.26
Protocolo 1	2.9	0.72	2.75	0.376	3.76
Protocolo 1	3.6	1.15	3.77	0.955	9.55
Protocolo 2	10.7	1.42	2.26	6.75	67.5
Protocolo 2	6.2	1.32	4.2	3.72	37.5
Protocolo 2	11.6	1.54	1.17	7.03	70.3
Protocolo 3	9.1	1.47	4.56	6.03	60.3
Protocolo 3	11.4	1.48	4.35	9.09	90.3
Protocolo 3	9	1.54	3.86	6.19	61.9

ANEXO 8: CUADROS ANVA

Cuadro ANVA de Parastrephia lepidophylla

FV	GL	SC	CM	F	P
Prot	2	61.85	30.92	0.59	0.5811
error	6	3111.85	51.97		
total	8	373.70			

Cuadro ANVA de Baccharis microphylla

FV	GL	SC	CM	F	P
Prot	2	117.09	58.54	4.78	0.0574
error	6	73.55	12.25		
total	8	190.64			

Cuadro ANVA de Margiricarpus strictus

FV	GL	SC	CM	F	P
Prot	2	35.37	17.68	0.92	0.4486
error	6	115.48	19.25		
total	8	150.85			

Cuadro ANVA de Margiricarpus pinnatus

FV	GL	SC	CM	F	P
Prot	2	0,82	0.41	1.75	0.2851
error	4	0.94	0.23		
total	6	1.75			

Cuadro ANVA de Alchemilla pinnata

FV	GL	SC	CM	F	P
Prot	2	29.71	14.85	1.41	0.3447
error	4	42.24	10.56		
total	6	71.95			

Cuadro ANVA de Festuca orthophylla.

FV	GL	SC	CM	F	P
Prot	2	8.25	4.13	0.49	0.64
error	4	33.83	8.46		
total	6	42.07			

Cuadro ANVA de Poa candamoana

FV	GL	SC	CM	F	P
Prot	2	34.76	17.38	3.12	0.15
error	4	22.29	5.57		
total	6	57.05			

Cuadro ANVA de Calamagrostis vicunarun

FV	GL	SC	CM	F	P
Prot	2	29.23	14.62	0.84	0.542
error	2	34.6	17.3		
total	4	63.83			

Cuadro ANVA de Bromus sp.

FV	GL	SC	CM	F	P
Prot	2	19.82	9.91	1.19	0.3659
error	6	49.78	8.29		
total	8	69.59			

Cuadro ANVA de Muhlebergia peruviana

FV	GL	SC	CM	F	P
Prot	2	18.17	9.08	0.86	0.47
error	6	63.26	10.54		
total	8	81.43			

Cuadro ANVA de Muhlenbergia fastigiada

FV	GL	SC	CM	F	P
Prot	2	2.68	1.34	1.55	0.3175
error	4	3.45	0.86		
total	6	6.13			

Cuadro ANVA de Paspalum pygmaeum

FV	GL	SC	CM	F	P
Prot	2	3042.62	1521.31	8.36	0.0184
error	6	1091.28	181.88		
total	8	4133.90			

Cuadro ANVA de Trifolium amabile

FV	GL	SC	CM	F	P
Prot	2	77.04	38.52	11.03	0.0098
error	6	20.95	3.49		
total	8	98.00			