

CARACTERIZACIÓN INTRAGENOTÍPICA DE SIETE ACCESIONES DE TARWI (*Lupinus mutabilis* Sweet.) USANDO MARCADORES MOLECULARES ISSR

INTRAGENOTYPIC CHARACTERIZATION OF SEVEN ACCESSIONS OF TARWI (*Lupinus mutabilis* Sweet.) USING ISSR MOLECULAR MARKERS

Angela F. Sota-Cano¹  Jorge Jiménez-Dávalos²  César F. López-Bonilla² 
Eric Rosales-Espinoza²  Yuliza Anchari-Oblitas¹ 

¹Universidad Tecnológica de los Andes-Cusco-Perú.

²Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima, Perú.

Correspondencia:

Angela F. Sota-Cano
asotac@utea.edu.pe

Como citar este artículo: Sota-Cano, F., Jiménez, J., López, C., Rosales, E., & Anchari, Y. (2022). Caracterización intragenotípica de siete accesiones de Tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet.) usando marcadores moleculares ISSR. *Revista de Investigación Hatun Yachay Wasi*, 1(2), 69 - 82. <https://doi.org/10.57107/hyw.v1i2.25>

RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue caracterizar siete accesiones de Tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet), provenientes del banco de germoplasma del INIA. Se utilizaron marcadores moleculares de inter-repeticiones de secuencia simple (ISSR), seleccionándose 10 iniciadores para amplificar el ADN de 91 individuos (semillas) en estudio, 13 por accesión, detectándose un total de 247 loci. Estos iniciadores fueron altamente informativos con un contenido de información polimórfica (PIC) promedio de 0.33. El principal factor de flujo genético *in situ*, entre estas accesiones, fue el intercambio o venta de semillas en ferias o mercados aledaños a la zona de colecta, debido a lo agreste de estos lugares. La predominante polinización autógena de *L. mutabilis* y la agrupación de las accesiones en el fenograma basado en el análisis de similitud, mostraron la alta probabilidad del incremento de alogamia durante la regeneración del cultivo, considerándose uno de los principales factores de flujo genético durante este periodo.

Palabras clave: *Lupinus mutabilis* Sweet., variabilidad genética, ISSR, banco de germoplasma.

ABSTRACT

The objective of this research was to characterize seven accessions of Tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet), from the INIA germplasm bank. Molecular markers of simple sequence inter-repeats (ISSR) were used, selecting 10 primers to amplify the DNA of 91 individuals (seeds) under study, 13 per accession, detecting a total of 247 loci. These primers were



highly informative with an average polymorphic information content (PIC) of 0.33. The main factor of in situ gene flow, among these accessions, was the exchange or sale of seeds at fairs or markets close to the collection area, due to the ruggedness of these places. The predominant autogamous pollination of *L. mutabilis* and the grouping of the accessions in the phenogram based on the similarity analysis, showed the high probability of the increase in outcrossing during crop regeneration, being considered one of the main factors of gene flow during this period.

Keywords: *Lupinus mutabilis* Sweet., genetic variability, ISSR, germplasm bank.

INTRODUCCIÓN

El Perú es un país megadiverso que cuenta con importantes recursos genéticos animales y vegetales. Las especies nativas constituyen un alto potencial para la alimentación, salud y desarrollo del país; sin embargo, muchas de ellas dejaron de ser utilizadas masivamente desde la época colonial y hoy son escasamente conocidas. Un ejemplo de ellas es el tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet.), leguminosa anual que empieza a recobrar importancia a nivel mundial, debido a su alta capacidad para restituir la fertilidad del suelo (Estela, 2022) y por su elevado valor nutritivo, rico en proteínas (40 %), aceites (20 %) presentes en sus semillas (Gulisano et al., 2019) y posee un elevado grado de digestibilidad (95 %), considerándose un alimento importante para la dieta humana (Atchinson et al., 2016).

Sin embargo, pese a sus extraordinarias características nutricionales el cultivo de tarwi se ve limitado a ciertas zonas de la región Andina (Atchinson et al., 2016). Esto pudiera ser atribuido a su bajo rendimiento, influenciado por el medio ambiente y a su indeterminado tiempo de crecimiento y maduración de la vaina; así como, a la falta de difusión de sus formas de uso y su alto contenido de alcaloides quinolizidínicos entre los que destacan la esparteína, lupinina y lupanidina (Cortés et al, 2020).

Debido a las características negativas antes mencionadas, se han desarrollado programas de

fitomejoramiento, dentro y fuera del país, que hacen uso de la gran variabilidad genética de esta especie, para seleccionar y desarrollar nuevas variedades que cuenten con mejores características agronómicas y nutricionales.

Según Morrell & Mayer (2017), esta gran variabilidad requerida por los fitomejoradores se encuentra colectada en los bancos de germoplasma; no obstante, el conocimiento de la estructura genética y la relación existente entre el material disponible es escaso, lo que impide su utilización en el mejoramiento (Cabrera, 2016). Esto sumado a la premisa de que la supervivencia a largo plazo de una especie depende de la suficiente cantidad de diversidad genética que presente, para responder a nuevas presiones de selección generadas por cambios ambientales (Cabrera, 2016; Chirinos-Arias, 2015), lo que hace importante la caracterización del germoplasma.

Según Mateos (2019), el germoplasma almacenado debe ser regenerado cada cierto tiempo, para garantizar su viabilidad y mantener la integridad genética de las colecciones. En el caso de las accesiones de *L. mutabilis* provenientes del banco de 34 germoplasmas del Instituto de Investigación Agraria (INIA), estas son regeneradas según protocolos ya establecidos y muy difundidos en diferentes instituciones, como Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT) y el

Centro Internacional Agrícola Tropical (CIAT del inglés *International Center for Tropical Agriculture*), bajo la premisa de que esta especie es autógama. Sin embargo, observaciones morfológicas directas (color de semilla) realizadas por el Programa de Cereales y Granos Nativos durante este periodo, hacen presumir la polinización cruzada de algunas de estas accesiones.

Para el análisis de la diversidad genética se hace uso, comúnmente, del sistema de marcadores de ADN basados en PCR (*Polymerase Chain Reaction*) entre los que destacan: los RAPD (*Random Amplification of Polymorphic DNA*), AFLP (*Amplified Fragment Length Polimorphism*) y SSR (*Simple Sequence Repeat*) (García & Cueva, 2021). Las principales limitaciones de estos métodos son la baja reproducibilidad en el caso de RAPD, el alto costo (AFLP) y la necesidad de conocer las secuencias flanqueantes, para desarrollar iniciadores específicos (SSR) (Ponce, 2013). Según Díaz (2013), la técnica de marcadores moleculares de ISSR (Inter-Simple Sequence Repeat) o Inter-Repeticiones de Secuencia Simple (Zietkiewicz et al., 1994), supera la mayoría de estas limitaciones y ha sido ampliamente utilizada en diversos cultivos sin el conocimiento previo de las secuencias genómicas (Nadeem et al. 2018) que, para la mayoría de los cultivos andinos, como el tarwi, aún no están disponibles.

Por lo anterior descrito, el objetivo de estudio fue caracterizar intragenotípicamente siete accesiones de tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet.) utilizando marcadores moleculares ISSR.

MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo de investigación se realizó en el laboratorio de Marcadores Moleculares y tinglado del Programa de Cereales y Granos Nativos de la Universidad Nacional Agraria La Molina.

Siembra, cultivo y recolección de accesiones de *L. mutabilis*

Veinte semillas de cada accesión fueron sembradas en pequeñas macetas, codificadas, conteniendo tierra vegetal y musgo como sustrato bajo condiciones de tinglado en el Programa de Cereales y Granos Nativos de la UNALM. Se procedió a recolectar 26 hojas jóvenes de trece individuos por accesión (dos hojas jóvenes por individuo). Este material fue almacenado por separado en bolsas plásticas (una bolsa plástica por individuo), codificadas, conteniendo sílica gel. El material vegetal permaneció en sílica gel durante dos días; posteriormente, fue transferido a tubos Eppendorf de 1.5 mL que contenían ocho billas de metal previamente autoclavadas. Para la molienda se hizo uso de un molino Mill 200 para muestras secas. Las muestras fueron molidas a 300 rpm durante seis minutos.

EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DEL ADN

Para analizar la variación intra-accesión, se extrajo por separado el ADN de 13 individuos de cada accesión. La extracción se realizó según con el método micro CTAB establecido por Doyle & Doyle (1987) con algunas modificaciones realizadas en el área de Marcadores Moleculares del Programa de Cereales y Granos nativos (Sota, 2012).

Medida de la pureza y concentración del ADN:

La determinación de la pureza y concentración del ADN se realizó con ayuda de un Biofotómetro (Eppendorf) midiendo las tasas de absorbancias a 260 nm sobre 280 nm, para estimar la pureza del ADN extraído. La concentración del ADN extraído (ng/ μ l) se obtuvo directamente del Biofotómetro (Eppendorf) mediante la siguiente fórmula empírica: $A_{260} \times 50 \text{ ng}/\mu\text{l} \times \text{factor de dilución}$ (198 $\mu\text{l}/2 \mu\text{l}$). Donde 50 ng/ μ l es por regla general la concentración de ADN cuando se tiene $A_{260} = 1.0$ (Karp et al., 1998).

Medida de la calidad del ADN

Fue evaluada mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 %. Las muestras fueron sometidas a 90 voltios por 30 minutos. Luego de este tiempo, el ADN fue visualizado y se capturó su imagen en el Gel Doc 2000 (BIO-RAD) por medio del programa Quantity One.

AMPLIFICACIÓN DEL ADN

Las muestras de ADN fueron diluidas a 10 ng/μl y se realizó la amplificación del ADN adaptando el protocolo desarrollado por Zietkiewicz et al. (1994). La reacción se llevó a cabo en un termociclador Eppendorf Mastercycle gradient 96 mediante el programa ISSR48k estandarizado para los iniciadores (Tabla 1) por el Laboratorio de Marcadores Moleculares del Programa de Cereales y Granos Nativos.

a. Programa de amplificación: El programa de amplificación ISSR48K consiste en una primera desnaturalización a 94°C por tres minutos, seguida de 39 ciclos de: desnaturalización (94°C por 30 segundos), hibridación (48°C por 45 segundos), extensión (72°C por 2 minutos) y una extensión final a 72°C por seis minutos.

b. PRE-selección de iniciadores ISSR: De los 42 iniciadores o primers ISSR previamente evaluados (Chirinos-Arias et al., 2015), 21 de ellos se eligieron para su posterior screening: iniciador Bor 5, Bor 7, 810, 811, 812, 813, 814, 815, 822, 823, 824, 834, 835, 841, 842, 844, 884, 887, 889, 890 y 891 (Tabla 1).

TABLA 1

Iniciadores ISSR utilizados durante el screening.

| Iniciador | | Secuencia 5'-3' | Iniciador | | Secuencia 5'-3' |
|--------------|--------------------|--------------------|------------|----------|---------------------|
| BOR 5 | (AG)8 | AGAGAGAGAGAGAGAG | 835 | (AG)8YC | AGAGAGAGAGAGAGAGYC |
| BOR7 | (AC)8 | ACACACACACACACAC | 841 | (GA)8YC | GAGAGAGAGAGAGAGAYC |
| 810 | (GA)8T | GAGAGAGAGAGAGAGAT | 842 | (GA)8YG | GAGAGAGAGAGAGAGAYG |
| 811 | (GA)8C | GAGAGAGAGAGAGAGAC | 844 | (CT)8RC | CTCTCTCTCTCTCTRC |
| 812 | (GA)8 ^a | GAGAGAGAGAGAGAGAA | 884 | HBH(AG)7 | HBHAGAGAGAGAGAGAG |
| 813 | (CT)8T | CTCTCTCTCTCTCTT | 887 | DVD(TC)7 | DVDTCTCTCTCTCTC |
| 814 | (CT)8 ^a | CTCTCTCTCTCTCTA | 889 | DBD(AC)7 | DBDACACACACACACAC |
| 815 | (CT)8G | CTCTCTCTCTCTCTG | 890 | VHV(GT)8 | VHVTGTGTGTGTGTGTGT |
| 822 | (TC)8A | TCTCTCTCTCTCTCA | 891 | HVH(TG)9 | HVHTGTGTGTGTGTGTGTG |
| 823 | (TC)8G | TCTCTCTCTCTCTCC | | | |
| 824 | (TC)8G | TCTCTCTCTCTCTCG | | | |
| 834 | (AG)8YT | AGAGAGAGAGAGAGAGYT | | | |

Nota : Zietkiewicz et al., 1994, B = T/C/G, D = A/T/C, V = A/C/G, Y = C/T y H = A/T/C.

Utilizando el programa ISSR48K se procedió al screening de los 21 iniciadores ISSR antes mencionados. Diez iniciadores con patrones de bandas claras y polimórficos fueron seleccionados para el análisis de toda la población en estudio.

Electroforesis en gel de acrilamida

Los fragmentos de ADN amplificados fueron separados en geles de poliacrilamida. Seguidamente, se realizó la pre-corrída de este a 300 V, 120 mA y 40 W por 1 h. Para determinar el peso aproximado de las bandas, se empleó 1.5 µl de marcador de peso de 100 pb (GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder Plus) que corría junto con las muestras. Las condiciones óptimas de corrída fueron: 150 V, 120 mA y 40 W por 16 h.

Fijación, tinción y revelado de geles de acrilamida

Para visualizar los productos de amplificación se utilizó la técnica de tinción con nitrato de plata.

Análisis de datos

Se asumió un mismo locus a los fragmentos de ADN de igual peso molecular y movilidad generados por un mismo iniciador (Pinchi, 2016), donde cada banda de un individuo representó el fenotipo de un solo locus bialélico.

Lectura de geles

Se leyeron los fragmentos de ADN generados entre el rango de 3000 a 300 pb rango aceptable por la técnica de Sbabou et al., (2010) (0.1-2.9 kpb) para el mismo género. Los fragmentos amplificados se leyeron como datos binarios de presencia (1) – ausencia, (0) y con ellos se formó la matriz básica de datos en Excel 2003. Se consideraron homólogos a las bandas que co-migraron en el gel (Pinchi, 2016) como es común en el análisis de diversidad a bajos niveles taxonómicos.

Estimación del índice de contenido polimórfico (PIC)

Se identificó el iniciador más informativo mediante

el contenido de información polimórfico (PIC). En el caso de ISSR, $PIC=1-p^2-q^2$, donde p =frecuencia de la banda, q =frecuencia de no banda, con valores de 0 a 0.5.

Estimación de la variabilidad genética

Se calculó la variabilidad genética a nivel de accesión, mediante el porcentaje de loci polimórficos (P) que es el número de loci polimórficos entre el número total de loci por 100 (Legaria, 2010).

Estimación de las relaciones genéticas

Se estimaron las relaciones genéticas a nivel de accesión a partir de las matrices de similitud usando el coeficiente de similitud de Jaccard (1908). Este coeficiente se eligió para minimizar la influencia de los fragmentos no homólogos (Bussell et al., 2005).

Se construyeron los fenogramas a partir del método de agrupamiento basado en distancias UPGMA (*Unweighed Pair-Group Method with Arithmetic Averages*) y Conglomerado Secuencial Aglomerativo, Jeráquico y Anidado (SAHN) (Sneath & Sokal, 1973) con el programa NTSYS v2.02 (Rohlf, 1998).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Determinación del iniciador más informativo y polimórfico

Según Morrell & Mayer (2017), dos estrategias son aplicables en el análisis de la estructura genética utilizando marcadores dominantes: La primera consiste en el análisis de un gran número de accesiones utilizando pocos iniciadores mientras que, la segunda en analizar pocas accesiones y un gran número de loci. En este estudio se hizo uso de la segunda estrategia analizando un total de 247 loci. Valor que, según el mismo autor, se encuentra dentro del rango de loci comúnmente analizados en estudios de diversidad genética utilizando marcadores dominantes. Además, un promedio de 55.2 % de loci fueron monomórficos, valor que superó el mínimo requerido (20 %) como control de

homología (Bussell et al., 2005).

La frecuencia de bandas o marcadores ISSR por iniciador fue de 24.7 bandas en promedio. El 44,8 % del total de loci analizados fueron marcadores ISSR o loci polimórficos. Ya que se analizaron las siete accesiones por separado se calculó un promedio de loci polimórficos por iniciador para toda la población de *L. mutabilis* (91 individuos pertenecientes a las siete accesiones analizadas) en estudio (Tabla 2).

En la Tabla 2, se puede apreciar que el iniciador más informativo fue 834 (PIC= 0.39) seguido por los iniciadores 841, 835 y BOR5 todos con PIC= 0.36.

Así mismo, se ha observado que la proporción del motivo (GA)_n (revelada por el promedio de bandas o loci generados por iniciadores que contenían este motivo) fue mucho mayor que la de (AC)_n, (GT)_n y (TG)_n y similar a (AG)_n (Tabla 2). Dato que concuerda con lo reportado por Sbabou et al. (2010) donde (GA)_n presentaba una proporción mayor que (AC)_n en el genoma de *Lupinus albus*, *L. cosentinii* y *L. luteus* y que, según el mismo autor, ha sido descrita en varias especies de plantas. Cabe señalar que la abundancia del microsatélite (GA)_n aparentemente está relacionada con la regulación de la expresión genética en plantas y animales.

TABLA 2

Polimorfismo de productos de amplificación de las siete accesiones de *L. mutabilis*.

PIC: Índice de contenido polimórfico; % P: porcentaje de loci polimórfico.

| Iniciador | Secuencia 5'-3' | Promedio PIC | Promedio de loci polimórficos | Total de loci | % P |
|------------------------------|----------------------|--------------|-------------------------------|---------------|------|
| BOR5 | (AG) ₈ | 0.36 | 7.3 | 16 | 45.6 |
| 811 | (GA) ₈ C | 0.32 | 9.3 | 18 | 51.6 |
| 834 | (AG) ₈ YT | 0.39 | 20.4 | 29 | 70.4 |
| 835 | (AG) ₈ YC | 0.36 | 13.6 | 28 | 48.5 |
| 841 | (GA) ₈ YC | 0.36 | 22.0 | 36 | 61.1 |
| 842 | (GA) ₈ YG | 0.31 | 8.6 | 31 | 27.7 |
| 884 | HBH(AG) ₇ | 0.34 | 12.6 | 24 | 52.4 |
| 889 | DBD(AC) ₇ | 0.34 | 5.1 | 17 | 30.3 |
| 890 | VHV(GT) ₈ | 0.22 | 3.4 | 25 | 13.7 |
| 891 | HVH(TG) ₇ | 0.32 | 8.4 | 23 | 36.7 |
| Total, de iniciadores | - | | 110.7 | 247 | 44.8 |

Debido a que el microsatélite (AG)_n ha demostrado estar ampliamente distribuido en el genoma de *Lupinus sp.* (Chirinos-Arias et al., 2015; Sbabou et al., 2010) y a que los iniciadores sin anclaje no son selectivos a ciertas regiones blanco, como los iniciadores anclados, condición que les permite amplificar las regiones blanco de iniciadores anclados en el extremo 3' y las que estos no pueden amplificar por su selectividad, se esperaría que el iniciador BOR5 sea más polimórfico que los iniciadores 834 y 835. Sin embargo, los resultados muestran lo contrario (Tabla 2) condición que ya ha sido reportada por Hakki et al. (2007) donde el porcentaje de polimorfismo de BOR5 (P= 88.8 %) fue menor al encontrado por (AG)₈CG (P= 100%) en *L. albus* y que según Bornet & Branchard (2001), podría estar relacionado a la temperatura de hibridación ya que, la mayor riqueza de los patrones de bandas en iniciadores no anclados está determinada por la alta temperatura de hibridación (Ta) que debe ser mucho mayor a la temperatura de melting (Tm), pero no tan restrictiva como para inhibir la amplificación.

Esta condición no se cumplió para el iniciador antes mencionado ya que la Tm (49.2°C) fue mayor a la Ta (48°C). Por tanto, este factor pudo influir en el polimorfismo del iniciador BOR5 que se reportó mayor en *Lupinus albus*: P= 88.8% a Ta= 49.2°C (Hakki et al., 2007). Por otro lado, el iniciador más polimórfico y anclado en el extremo 5' fue el 884 (%P=52.4) cabe resaltar que este presenta en su estructura la repetición AG.

Como se evidencia en la Tabla 2, los iniciadores con repeticiones (GA)₈, (AG)₈ y (AG)₇ fueron los más polimórficos e informativos en comparación de todos los iniciadores utilizados en este estudio, con excepción del iniciador 842 (P= 27.7 %).

Además, mostraron los mejores patrones de bandas coincidiendo con los reportes de Girma et al. (2010) en cultivos de arroz.

Análisis de la variabilidad genética intra-accesión de las siete accesiones de *Lupinus mutabilis* Sweet.

De las siete accesiones analizadas, el porcentaje de bandas polimórficas (% P) mostró que la accesión de mayor variabilidad genética fue Ta33 (P= 53.9 %) seguida de Ta22 (P= 49.4 %), Ta27 y Ta16 ambas con P= 43.7% (Tabla 3). La diversidad genética del cultivo de tarwi expresada en porcentaje de loci polimórficos (P= 44.8%) reflejó la naturaleza de su sistema de apareamiento predominantemente autógeno, pero con cierto grado de alogamia (Tadele, 2015) como es común en especies de *Lupinus*. Es decir, un sistema mixto que le proporciona mayor diversidad comparada con plantas autógenas (e.g. *Amaranthus tricolor*: frijol: P= 36,67 %, Svetleva et al., 2006; arroz: P= 28.0%, Girma et al., 2010) pero menor con respecto a especies alógamas (eg. rabanito: P= 85.2 %, Liu et al., 2008; Astarini et al., 2006).

Según Barrett (2003), la variación genética entre especies de plantas generalmente refleja diferencias en el sistema de apareamiento ya que éste está íntimamente relacionado con el flujo genético. Según el mismo autor, las especies autógenas muestran baja dispersión de polen entre poblaciones lo que conlleva a una reducción de la diversidad genética dentro de la población.

Por tanto, la alta variabilidad genética dentro de las accesiones analizadas pudo deberse a su sistema de apareamiento mixto; sin descartar la influencia del manejo de las accesiones durante su regeneración.

TABLA 3

Polimorfismos de productos de amplificación de las siete accesiones de *L. mutabilis* para cada accesión.

| Accesión | Número total de loci | Número de loci polimórficos | % P |
|-----------------|----------------------|-----------------------------|------|
| Ta08 | 247 | 100 | 40.5 |
| Ta14 | 247 | 98 | 39.5 |
| Ta15 | 247 | 106 | 43.0 |
| Ta17 | 247 | 108 | 43.7 |
| Ta22 | 247 | 122 | 49.4 |
| Ta26 | 247 | 108 | 43.7 |
| Ta33 | 247 | 133 | 53.9 |
| Promedio | 247 | 110.7 | 44.8 |

Nota: % P: porcentaje de loci polimórfico.

Análisis realizados en otras especies de *Lupinus* utilizando marcadores ISSR han demostrado mayor porcentaje de polimorfismo que en *L. mutabilis*: *L. albus*: P= 88.9 % (Hakki et al., 2007); *L. cosentinii*: P= 100 % (Sbabou et al., 2010), esto pudiera deberse al número y tipo de iniciadores utilizados (con variados motivos y anclajes); así como, al tamaño del genoma analizado, ya que la variabilidad de los marcadores influye en la medición de la variabilidad genética (Eckert & Barrett, 1993), probablemente el uso de una mayor cantidad y variedad de iniciadores por Hakki et al. (2007) y Sbabou et al. (2010), permitió la amplificación de marcadores no ligados a una región específica del genoma y por tanto, el análisis de gran parte de este y no sólo de una región. En contraste, en este estudio se utilizaron iniciadores con el mismo motivo y número de repeticiones.

Análisis de las relaciones genéticas intra e inter-accesión de las siete accesiones de *Lupinus mutabilis* Sweet.

Con el fin de estimar las relaciones genéticas dentro y entre las accesiones estudiadas, se construyeron fenogramas basados en similitudes genéticas (considerando 47 loci) para cada accesión y entre ellas; utilizando el coeficiente de similitud Jaccard (1908). Cabe resaltar que este coeficiente ha sido

ampliamente utilizado en el análisis de especies del mismo género como *Lupinus albus*, *L. angustifolius* y *L. luteus* (Yorgancilar et al, 2009).

Los valores de similitud entre individuos de una misma accesión fueron variables, presentando los siguientes rangos: de J= 0.80 a 0.89 en la accesión con mayor similitud genética (Ta14), seguido de J= 0.78 a 0.88 para Ta26 y Ta08, J= 0.77 a 0.87 en Ta15, J= 0.75 a 0.85 en Ta17, J= 0.74 a 0.87 para Ta33 y J= 0.71 a 0.86 en Ta22. Estos rangos de similitud genética entre individuos de una misma entrada y por tanto la alta variabilidad genética intra-accesión podrían estar relacionados con el grado de polinización cruzada del cultivo (Tadele, 2015) que, como se conoce, varía con el genotipo y según diferentes factores ambientales (humedad, luz, temperatura, etc). Se ha reportado en algunas gramíneas el incremento del grado de alogamia al ser cultivadas en ambientes tropicales o subtropicales; condición que probablemente se estaría observando en la población analizada y que explicaría la mezcla de color de testa observada en campo por el Programa de Cereales y Granos Nativos durante la regeneración de este germoplasma.

Cabe resaltar que el indicador “color de semilla”

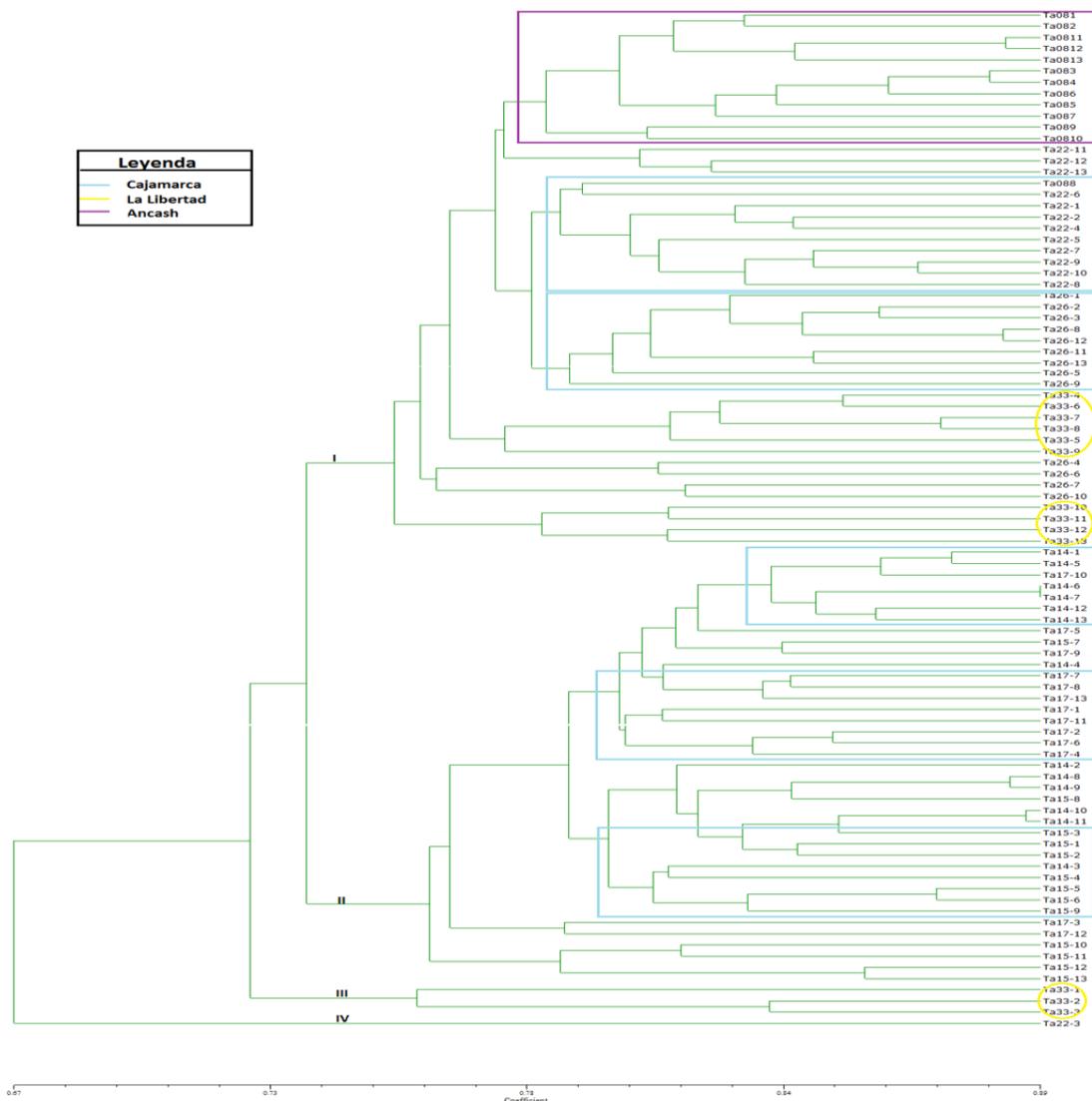
es uno de los mejores indicadores de polinización cruzada en *L. mutabilis* (Horovitz & Harding, 1983). No se descarta la influencia del constante flujo de material genético (semillas) entre las localidades debido a ferias locales o ventas en mercados aledaños a las zonas de cultivo como en el caso del mercado de Cajabamba aledaño a las zonas de colecta (cultivo) de Ta17 y Ta15 y/o al mal manejo del cultivo durante su regeneración.

intra-accesión se prosiguió a realizar el análisis inter-accesión. Para ello, se corroboraron los datos pasaporte de cada una de las entradas analizadas encontrándose que el departamento, provincia y distrito correspondientes a la accesión Ta15 no eran correctas. De acuerdo con las coordenadas de toma de muestra, esta accesión pertenece al departamento de Cajamarca, provincia de Cajabamba. De esta manera, se explica la agrupación de Ta15 con Ta14 y Ta17 que también pertenecen a la misma zona (Fig. 2).

Para analizar de mejor manera las probables fuentes que estarían influyendo en la variabilidad

FIGURA 2

Fenograma inter-accesión de las siete accesiones de *L. mutabilis*



Este fenograma fue basado en el análisis de similitud genética (coeficiente Jaccard) utilizando 247 loci. En números romanos se detallan los principales conglomerados.

De acuerdo con el fenograma inter-acesión (Fig 2) casi todos los individuos correspondientes a una acesión determinada se agruparon y en general de acuerdo con su distribución geográfica. Se observó a una similitud de 0,73 una clara distinción de dos grupos o conglomerados principales I y II, además de cuatro accesiones que conforman los grupos III y IV.

En el primer conglomerado se agruparon el 100% de accesiones pertenecientes al departamento de Ancash (Ta08), el 40 % de las pertenecientes al departamento de Cajamarca (Ta22 y Ta26) y 10 individuos de la acesión Ta33 del departamento de la Libertad (Fig 2). Dentro de este, a una similitud de 0.774 se puede apreciar la separación de la acesión Ta08 formando un grupo definido en la parte superior del dendograma. La asociación de esta acesión con otras geográficamente muy distantes se pudo deber al movimiento de germoplasma por parte de pobladores de la zona. Por otro lado, la agrupación de Ta26 y Ta22 probablemente se debió a su relativa cercanía (71 km) que, si bien no contribuyó a la polinización cruzada, por la misma distancia y lo abrupto de la zona, si pudo contribuir con el intercambio de semillas y/o comercio de ellas.

Además, según el ministerio de Agricultura Peruano (2022) tres son las principales ferias en el departamento de Cajamarca: El Fongal en Cajamarca-Baños del Inca; la feria agropecuaria, artesanal, agroindustrial, turística y folclórica de Cutervo y por último, la feria agropecuaria, agroindustrial y artesanal de Chota. Esta última, ubicada a 51 km y 35 km de las zonas de colecta y cultivo de las accesiones Ta22 y Ta26 respectivamente. La relativa cercanía con esta feria local podría explicar

la similitud genética de Ta22 y Ta26, debido a que se asume la migración de este germoplasma hasta esa zona y su posterior intercambio o venta. Caso similar, pudo ocurrir con las accesiones Ta14, Ta15 y Ta17, ya que estas se encontraban cerca de la zona donde se realiza la Feria del "Fongal".

En el segundo conglomerado, se agruparon las entradas Ta14, Ta15 y Ta17 todas ellas pertenecientes al departamento de Cajamarca, provincia de Cajabamba. De las cuales, Ta14 y Ta17 mostraron máxima similitud genética ($J= 0.785$). A pesar de la relativa cercanía de las tres accesiones antes mencionadas (36 km en promedio) y del tipo de polinización de *L. mutabilis*, no se cree posible el flujo genético por migración de polen debido a condiciones geográficas.

Ya que *L. mutabilis* es una especie predominantemente autógama (Tadele, 2015), el manejo de ésta durante la regeneración de sus accesiones es el comúnmente aplicado por diversas instituciones (eg. CIMMYT, CIAT) para especies autógamas. Sin embargo, este método podría no ser el más adecuado ya que, como se mencionó anteriormente, observaciones fenotípicas directas realizadas por el Programa de Cereales y Granos Nativos evidenciaron combinación de colores de testa entre algunas accesiones. Teniendo en cuenta los hechos antes mencionados y los resultados presentes se presume la polinización cruzada entre las accesiones Ta33 y Ta26 durante su regeneración ya que individuos de Ta33 se agruparon tanto en el conglomerado I y III (Fig. 2). No se descarta la influencia del mal manejo de estas entradas durante la cosecha en el mismo periodo.

Finalmente, la formación del conglomerado IV a una similitud $J= 0.67$ y con un solo individuo de la acesión Ta22 demostraría la gran presencia de datos codificados como 9. Lo que está relacionado a la pérdida de información durante la caracterización de este individuo.

Por otro lado, la coherencia del fenograma inter-accesión con los datos pasaporte y la localización de las ferias locales (Figuras 12 y 13) apoyarían la fiabilidad del uso de marcadores ISSR en el estudio de *Lupinus mutabilis* ya que, según los resultados antes mencionados, se ha analizado correctamente el genoma de esta especie y no solo un sector de este.

CONCLUSIONES

- La diversidad genética intra-accesión del tarwi, según las accesiones y marcadores ISSR evaluados, es considerable. Presentando la mayor diversidad genética la accesión Ta33 ($h=0.1936$ y $PPB=53.85\%$) seguida por Ta22 ($h=0.1664$ y $PPB=49.80\%$).
- El uso de iniciadores ISSR para este cultivo es fiable porque los resultados han mostrado la coherencia del fenograma inter-accesión, basado en el análisis de similitud, con los datos pasaporte y la localización de las ferias locales.
- El iniciador de mayor eficiencia para detectar loci polimórficos en la población analizada es 834 ($PIC=0.39$) seguido por 841, 835 y BOR5 todos con $PIC=0.36$. Estos iniciadores, presentaron motivos (GA) $_n$ o (AG) $_n$ que han demostrado, mediante el promedio de loci generados por iniciadores que contenían estos motivos, estar ampliamente distribuidos en el genoma de *L. mutabilis* como ocurre en otras especies de este mismo género.
- Por lo agreste de las zonas de colecta, la predominante polinización autógena de *L. mutabilis* y la agrupación de las accesiones en el fenograma basado en el análisis de similitud, se considera como uno de los principales factores de flujo genético *in situ* al intercambio o venta de semillas en ferias o mercados aledaños a la zona de colecta.

- Existe una alta probabilidad de que el incremento del grado de alogamia durante la regeneración del cultivo sea uno de los principales factores de flujo genético durante este periodo. Lo que explicaría la mezcla de color de testa de estas accesiones.
- Las accesiones Ta14 y Ta17 presentan la menor distancia genética (0.0238) y por ende la mayor similitud genética entre las accesiones analizadas; mientras que, Ta15 y Ta26 presentan la mayor distancia genética (0.0994).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Astarini, I., Plummer J., Lancaster R. & Yan G. (2006). Genetic diversity of Indonesian cauliflower cultivars and their relationships with hybrid cultivars grown in Australia. *Scientia Horticulturae* 108: 143-150. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2006.01.033>
- Barrett S. (2003). Mating strategies in flowering plants: the outcrossing-selfing paradigm and beyond. *Philosophical transactions of the Royal Society of London*, 358, 991-1004. doi: 10.1098/rstb.2003.1301
- Barth, S., Melchinger, E., & Lubberstedt, T. (2002). Genetic diversity in *Arabidopsis thaliana* L. Heynh. investigated by cleaved amplified polymorphic sequence (CAPS) and inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. *Molecular Ecology*, 11: 495-505. DOI: 10.1046/j.0962-1083.2002.01466.x
- Bornet B., & Branchard., (2001). Nonanchored Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) Markers: Reproducible and Specific Tools for Genome Fingerprinting. *Plant Molecular Biology Reporter* 19, 209-215. DOI:10.1007/BF02772892
- Bussell, J., Waycott, M., & Chappill, J. (2005).

- Arbitrarily amplified DNA markers as characters for phylogenetic. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* 7: 3-26. DOI:10.1016/j.ppees.2004.07.001
- Cabrera, F. (2016). *Mejoramiento genético de plantas: Segunda Edición*. Universidad Nacional de Colombia.
- Chirinos-Arias, M., Jiménez, J., & Vilca-Machaca, L. (2015). Analysis of Genetic Variability among thirty accessions of Andean Lupin (*Lupinus mutabilis* Sweet) using ISSR molecular markers. *Scientia Agropecuaria*, 6(1), 17-30. DOI:10.17268/sci.agropecu.2015.01.02
- Cortés-Avenidaño, P., Tarvainen, M., Suomela, J., Glorio-Paulet, P., Yang, B., & Repo-Carrasco-Valencia, R. (2020). Profile and content of residual alkaloids in ten ecotypes of *Lupinus mutabilis* Sweet after aqueous debittering process. *Plant Foods for Human Nutrition*, 75(2), 184-191. <https://doi.org/10.1007/s11130-020-00799-y>
- Doyle, J., & Dole, J. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, 19, 11-15. <https://worldveg.tind.io/record/33886/>
- Eckert, C., Barrett, S. (1993). Clonal reproduction and patterns of genotypic diversity in *Decodon verticillatus* (Lythraceae). *American Journal of Botany*, 80, 1175–1182 <https://www.jstor.org/stable/2445546>
- García-Godos, P., & Cueva-Castillo, J. (2021). Variabilidad genética de 29 accesiones de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd) peruana mediante marcadores AFLP y análisis multivariante. *Scientia Agropecuaria*, 12(1), 57-64. <https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2021.007>
- Garris, A., Tai, T., Coburn, J., Kresovich, S., & McCouch, S. (2005). Genetic Structure and Diversity in *Oryza sativa* L. *Genetics*, 169, 1631-1638. doi: 10.1534/genetics.104.035642
- Girma, G., Tesfaye, K., & Bekele, E. (2010). Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) analysis of wild and cultivated rice species from Ethiopia. *African Journal of Biotechnology*, 9(32): 5048-5059. <https://www.ajol.info/index.php/ajb/article/view/92129>
- Gulisano, A., Alves, S., Martins, J., & Trindade, L. (2019). Genetics and breeding of *Lupinus mutabilis*: An emerging protein crop. *Frontiers in Plant Science*, 10, 1385. doi: 10.3389/fpls.2019.01385
- Hailu, F., Merker, A., Belay G., & Johansson, E. (2005). Molecular diversity and phylogenetic relationships of tetraploid wheat species as revealed by inter-simple sequence repeats (ISSR) from Ethiopia. *Journal of Genetics. & Breeding*, 59: 329-338. https://www.researchgate.net/profile/Faris-Hailu/publication/288467372_Molecular_diversity_and_phylogenetic_relationships_of_tetraploid_wheat_species_as_revealed_by_inter-simple_sequence_repeats_ISSR_from_Ethiopia/links/5c88f4fb299bf14e7e78694b/Molecular-diversity-and-phylogenetic-relationships-of-tetraploid-wheat-species-as-revealed-by-inter-simple-sequence-repeats-ISSR-from-Ethiopia.pdf
- Hakki, E., Yorgancilar, M., Atalay, E., Uyar, S., & Babaoglu, M. (2007). Basit tekrarlı diziler arası polimorfizm (BTDAP=ISSR) tekniği ile yerli lupen genotiplerinde (*Lupinus albus* L.) genetik varyasyonun belirlenmesi. *Bitkisel Arastırma Dergisi*, 2, 1-5. <https://arastirma.tarimorman.gov.tr/bahridagdas/Belgeler/Eski%20Dergiler/2007-2/1-2007-8%20M.YORGANCILAR%20sf.1-5.pdf>

- Horovitz, A., & Harding, J. (1983). Genetics of *Lupinus*. XII. The mating system of *Lupinus pilosus*. *Botanical Gazette*, 144 (2), 276-279. <https://www.jstor.org/stable/2474653>
- Jaccard, P. (1908). Étude comparative de la distribution florale dans une portion des Alpes et des Jura. *Bulletin de la Société Vaudoise des Sciences Naturelles*, 37, 547-579. DOI:10.5169/seals-266450
- Karp, A., Isaac, P., & Ingram, D. (1998). *Molecular tools for screening biodiversity plants and animals*. Great Britain: Chapman & Hall; pp. 5-24. <https://link.springer.com/book/10.1007/978-94-009-0019-6>.
- Legaria, J. (2010). Diversidad genética en algunas especies de amaranto (*Amaranthus spp.*). *Revista Fitotecnia Mexicana*, 33(2), 89-95. <https://www.redalyc.org/pdf/610/61013185001.pdf>
- Mateos, R. (2019). Identificación de genes implicados en la longevidad de semilla a partir de un GWAS y aproximación a sus mecanismos de acción.[Tesis de Maestría, Universitat Politècnica de València]. <http://hdl.handle.net/10251/118837>
- Ministerio de Agricultura Peruano. Calendario Nacional de Ferias y Eventos Agropecuarios 2022. El Peruano. 2022/11/20.
- Morrell, J., & Mayer, I. (2017). Reproduction biotechnologies in germplasm banking of livestock species: a review. *Zygote*, 25(5), 545-557. DOI: 10.1017/S0967199417000442
- Nadeem, M., Nawaz, M., Shahid, M., Doğan, Y., Comertpay, G., Yıldız, M., Hatipoğlu, R., Ahmad, F., Alsaleh, A., Labhane, N., Özkan, H., Chung, G., & Baloch, F. (2018). DNA molecular markers in plant breeding: current status and recent advancements in genomic selection and genome editing. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 32(2), 261-285. DOI: 10.1080/13102818.2017.1400401
- Pinchi, M. (2016). Mejoramiento del ecosistema de los aguajales de las comunidades, mediante la diferenciación sexual por la combinación de marcadores moleculares en plántulas de aguaje (*Mauritia flexuosa*) en la Región Ucayali. [Tesis Doctoral, Universidad Nacional Hermilio Valdizan]. <https://hdl.handle.net/20.500.13080/1770>
- Ponce., R. (2013). Caracterización molecular de las variedades de papas cultivadas (*Solanum spp.*) más importantes del Perú mediante el uso de microsatélites.[Tesis de Licenciatura, Universidad Nacional Mayor de San Marcos]. <https://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/20.500.12672/3429>
- Pradeep, M., Sarla, N., & Siddiq, E. (2002). Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. *Euphytica* 128: 9-17. <https://doi.org/10.1023/A:1020691618797>
- Sbabou, L., Brhada, F., Thami, I., & Filali, A. (2010). Genetic Diversity of Moroccan Lupinus Germplasm Investigated using ISSR and AFLP Markers. *International Journal of Agriculture & Biology* 12: 26-32. <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=PK2010001030>
- Slatkin, M. (1987). Gene Flow and the Geographic Structure of Natural Populations. *Science*, 236, 787. doi: 10.1126/science.3576198.
- Sota-Cano, A. (2012). Caracterización intragenotípica de siete accesiones de tarwi (*Lupinus mutabilis*

- Sweet) usando marcadores moleculares ISSR (No. F30 S76-T). [Tesis Doctoral, Universidad Nacional Agraria La Molina].
- Suryawanshi, A., Perane, R., Shinde, V., & Raghuwanshi, K. (2017). Genetic diversity in cultivated and wild Cotton (*Gossypium* sp.) in relation to responses to *Alternaria* leaf spot. *Annals of Plant Protection Sciences*, 25(2), 342-346. 10.5958/0974-0163.2017.00022.2
- Svetleva, D., Pereira, G., Carlier, J., Cabrita, L., Leitão, J., & Genchev, D. 2006. Molecular characterization of *Phaseolus vulgaris* L. genotypes included in Bulgarian collection by ISSR and AFLP TM analyses. *Scientia Horticulturae*, 109: 198-206. DOI:10.1016/j.scienta.2006.04.001
- Tadele, Y. (2015). White lupin (*Lupinus albus*) grain, a potential source of protein for ruminants: A review. *Research Journal of Agriculture Environmental Management*, 4, 180-188. https://www.academia.edu/19389710/White_Lupin_Lupinus_albus_grain_a_potential_source_of_protein_for_ruminants_
- Tungalag, M., Ariungerel, M., Otgonbayar, B., & Ya, M. (2018). Varietal identification study of six wheat varieties using ISSR markers. *Mongolian Journal of Agricultural Sciences*, 23(01), 14-17. <https://doi.org/10.5564/mjas.v23i01.1014>
- Wang, C., Zhang, H., Qian, Z., & Zhao G. (2008). Genetic differentiation in endangered *Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino based on ISSR polymorphism and its implications for conservation. *Biochemical Systematics and Ecology*, 36: 699-705. DOI:10.1016/j.bse.2008.07.004
- Yorgancilar, M., Babaoglu, M., Hakki, E. & Atalay, E. (2009). Determination of the relationship among Old World Lupin (*Lupinus* sp.) species using RAPID and ISSR markers. *Journal of Biotechnology*. 8 (15): 3524-3530. <https://academicjournals.org/journal/AJB/article-full-text-pdf/D7119BF6566>
- Zietkiewicz, E., Rafalski, A., & Labuda, D. (1994). Genome Fingerprinting by Simple Sequence Repeat (SSR)-Anchored Polymerase Chain Reaction Amplification. *Genomics*, 20, 176-183. doi: 10.1006/geno.1994.1151.