

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA

LA MOLINA

FACULTAD DE CIENCIAS



**“DISEÑO DE INICIADORES PARA EL ESTUDIO DE
FRAGMENTOS DE GENES DE LA BIOSÍNTESIS DE
GLUCOSINOLATOS AROMÁTICOS EN MASHUA Y MACA”**

Presentada por:

Paola Rossi Guerra Arzapalo

Tesis para Optar el Título Profesional de:

BIÓLOGO

Lima – Perú

2018

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA

LA MOLINA

FACULTAD DE CIENCIAS

**“DISEÑO DE INICIADORES PARA EL ESTUDIO DE
FRAGMENTOS DE GENES DE LA BIOSÍNTESIS DE
GLUCOSINOLATOS AROMÁTICOS EN MASHUA Y MACA”**

Presentada por:

Paola Rossi Guerra Arzapalo

Tesis para Optar el Título Profesional de:

BIÓLOGO

Sustentada y aprobada ante el siguiente jurado:

.....
Mg. César López Bonilla
PRESIDENTE

.....
Mg. Katty Ogata Gutiérrez
MIEMBRO

.....
Dr. Raúl Blas Sevillano
MIEMBRO

.....
Mg.Sc. Roberto Mansilla Samaniego
ASESOR

.....
Mg.Sc. Cinthia Sheila Quispe Apaza
Co ASESORA

DEDICATORIA

A mis padres que me dieron su amor,
Confianza y apoyo incondicional.
Y a mi novio Cesar que estuvo a mi lado en
todo momento.

AGRADECIMIENTO

En primer lugar quiero agradecer a Dios por darme la vida, la salud, y a todas esas personas que forman parte de mi vida.

Agradezco a mi padre que me apoyo incondicionalmente y con su ejemplo me enseñó a que con esfuerzo y decisión todo se puede conseguir.

A mi madre, y mejor amiga que me alentó y me dio palabras oportunas cuando más lo necesitaba.

A Cesar, el amor de mi vida, por alegrar mis días y apoyarme en todo momento.

Al Instituto de biotecnología de la Universidad Nacional Agraria la Molina por facilitarme las instalaciones y equipos necesarios para la realización de este trabajo.

A mi asesor Roberto Mansilla Samaniego por su paciencia, sus sugerencias y constante apoyo en la revisión y ejecución del presente trabajo.

A mi co asesora Cinthia por sus sugerencias y apoyo constante en el desarrollo de este trabajo.

A mis jurados, por sus sugerencias y tiempo en la corrección de mi tesis.

y todos aquellos que hicieron posible este trabajo...

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	i
ABSTRACT	ii
I. INTRODUCCION	1
II. REVISION DE LITERATURA	3
2.1. <i>Tropaeolum tuberosum</i> Ruiz & Pavón. “MASHUA”	3
2.1.1. Generalidades y clasificación taxonómica	3
2.1.2. Propiedades y usos del cultivo de mashua	4
2.1.3. Estudios genético molecular	6
2.2. <i>Lepidium meyenii</i> Walp. “MACA”	7
2.2.1. Generalidades y clasificación taxonómica	7
2.2.2. Propiedades y usos del cultivo de maca	8
2.2.3. Estudios genético molecular	10
2.3. GLUCOSINOLATO.....	10
2.3.1. Generalidades de los glucosinolatos	10
2.3.2. Biosíntesis de los glucosinolatos aromáticos	15
2.3.2.1. Elongación del aminoácido	15
2.3.2.2. Formación de la estructura del núcleo del glucosinolato	17
2.3.2.3. Modificación de la cadena lateral del glucosinolato	20
2.4. BIOINFORMÁTICA.....	20
2.4.1. Alineamiento múltiple de secuencias	21
2.4.2.1. Programación dinámica	21
2.4.2.2. Algoritmos heurísticos	22
2.4.2. Diseño de iniciadores <i>in silico</i>	23
III. MATERIALES Y MÉTODOS	26
3.1. LUGAR DE EJECUCIÓN.....	26
3.2. MATERIAL VEGETAL	26
3.3. METODOLOGÍA: BIOINFORMÁTICA	27
3.3.1. Búsqueda de secuencias	27
3.3.2. Alineamiento de secuencias nucleotídicas y aminoacídicas	28
3.3.3. Diseño de iniciadores “simples” y degenerados	28
3.4. EXTRACCIÓN DEL MATERIAL GENÉTICO	29

3.5. VALIDACIÓN DE LOS INICIADORES	31
3.5.1. Estandarización y prueba de reacción de la cadena de polimerasa (PCR) ..	31
IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	33
4.1. BÚSQUEDA Y ALINEAMIENTO DE SECUENCIAS	33
4.2. DISEÑO DE INICIADORES	47
4.3. VALIDACIÓN DE INICIADORES.....	58
4.3.1. Extracción de ADN	58
4.3.2. Amplificación de fragmentos de ADN	59
4.3.2.1. Amplificación de fragmentos con los iniciadores simples	60
4.3.2.2. Amplificación de fragmentos con los iniciadores degenerados	68
V. CONCLUSIONES	82
VI. RECOMENDACIONES.....	83
VII. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA.....	84
VIII. ANEXOS.....	96

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Tipos de glucosinolatos y sus respectivos aminoácidos precursores	11
Tabla 2: Código genético.....	29
Tabla 3: Información de los iniciadores simples del gen CYP79A2 obtenido en el programa <i>Primer3plus</i>	48
Tabla 4: Información de los iniciadores degenerados del gen CYP79A2 obtenido en el programa <i>Primer3plus</i>	49
Tabla 5: Información de los iniciadores degenerados del gen CYP83A1 obtenido en el programa <i>Primer3plus</i>	50
Tabla 6: Información de los iniciadores simples del gen CYP83B1 obtenido en el programa <i>Primer3plus</i>	52
Tabla 7: Información de los iniciadores degenerados del gen CYP83B1 obtenido en el programa <i>Primer3plus</i>	53
Tabla 8: Información de los iniciadores simples del gen SUR1 obtenido en el programa <i>Primer3plus</i>	54
Tabla 9: Información de los iniciadores simples del gen UGT74B1 obtenido en el programa <i>Primer3plus</i>	55
Tabla 10: Información de los iniciadores degenerados del gen UGT74B1 obtenido en el programa <i>Primer3plus</i>	57
Tabla 11: Concentración y pureza del ADN extraído de las muestras utilizadas	58
Tabla 12: Mezcla de reacción para la amplificación de iniciadores simples por PCR (Master mix).....	60
Tabla 13: Programa de PCR para los iniciadores simples.....	60
Tabla 14: Mezcla de reacción para la amplificación de iniciadores degenerados por PCR (Master mix)	68
Tabla 15: Programa de PCR touchdown para los iniciadores degenerados	69
Tabla 16: Resultados de la amplificación de fragmentos con los iniciadores simples y degenerados diseñados a partir de los genes de la ruta biosintética de glucosinolatos aromáticos, evaluados en genotipos de mashua y maca	80

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Glucosinolatos aromáticos encontrados en mayor proporción en las especies de mashua y maca	9
Figura 2: Estructura del glucosinolato	11
Figura 3: Elongación del aminoácido en la biosíntesis de glucosinolato aromático....	16
Figura 4: Ruta de los glucosinolatos aromáticos.....	19
Figura 5: Muestras de tubérculos de mashua evaluadas en la tesis. De izquierda a derecha: fenotipos de mashua A) amarilla, B) “yuracc wacca”, C) roja y D) negra.....	27
Figura 6: Muestras de hipocótilos de maca evaluadas en la tesis. De izquierda a derecha: fenotipos de maca A) blanca B) roja C) negra.....	27
Figura 7: Alineamiento nucleotídico de las secuencias encontradas del gen CYP79A2. Entre paréntesis se encuentra la posición de la zona conservada en el gen; y la zona sombreada de color rojo corresponde a la zona donde se diseñaron los iniciadores simples.....	34
Figura 8: Secuencias nucleotídicas provenientes del alineamiento de aminoácidos del gen CYP79A2. Entre paréntesis se encuentra la posición de la zona conservada en el gen; y las zonas sombreadas de color fucsia y rojo corresponde a las zonas donde se diseñaron los iniciadores degenerados.	35
Figura 9: Secuencias nucleotídicas provenientes del alineamiento de aminoácidos del gen CYP83A1. Entre paréntesis se encuentra la posición de la zona conservada en el gen.....	37
Figura 10: Alineamiento nucleotídico de las secuencias encontradas del gen CYP83B1. Entre paréntesis se encuentra la posición de la zona conservada en el gen	38
Figura 11: Alineamiento nucleotídico proveniente del alineamiento de aminoácidos del gen CYP83B1. Entre paréntesis se encuentra la posición de la zona conservada en el gen	40
Figura 12: Alineamiento nucleotídico de las secuencias encontradas del gen SUR1. Entre paréntesis se encuentra la posición de la zona conservada en el gen.....	41
Figura 13: Alineamiento nucleotídico de las secuencias encontradas del gen UGT74B1. Entre paréntesis se encuentra la posición de la zona conservada en el gen	42

Figura 14: Alineamiento nucleotídico proveniente del alineamiento de aminoácidos del gen UGT74B1. Entre paréntesis se encuentra la posición de la zona conservada en el gen	44
Figura 15: Alineamiento nucleotídico de las secuencias encontradas del gen ST5a. Entre paréntesis se encuentra la posición de la zona conservada en el gen	45
Figura 16: Alineamiento nucleotídico proveniente del alineamiento de aminoácidos del gen ST5a. Entre paréntesis se encuentra la posición de la zona conservada en el gen.....	46
Figura 17: Posición de los iniciadores simples en el gen CYP79A2 de <i>B. oleracea</i> var. Capitata. Se observa la ubicación de las zonas conservadas de color verde, y de color rojo la posición donde se diseñó el iniciador.....	48
Figura 18: Posición de los iniciadores degenerados en el gen CYP79A2 de <i>B. oleracea</i> var. Capitata. Se observa la ubicación de las zonas conservadas de color verde; y de color rojo y fucsia la posición donde se diseñó el iniciador	48
Figura 19: Posición de los iniciadores degenerados en el gen CYP83A1 de <i>B. oleracea</i> var. Capitata. Se observa la ubicación de las zonas conservadas de color verde; y de color azul, mostaza y fucsia, la posición donde se diseñaron los iniciadores	50
Figura 20: Posición de los iniciadores simples en el gen CYP83B1 de <i>B. oleracea</i> var. Capitata. Se observa la ubicación de las zonas conservadas de color verde; y de color celeste, rojo y fucsia, la posición donde se diseñaron los iniciadores	51
Figura 21: Posición de los iniciadores degenerados en el gen CYP83B1 de <i>B. oleracea</i> var. Capitata. Se observa la ubicación de las zonas conservadas de color verde; y de color azul, rojo, fucsia, morado y anaranjado, la posición donde se diseñaron los iniciadores	53
Figura 22: Posición de los iniciadores simples en el gen SUR1 de <i>B. oleracea</i> var. Capitata. Se observa la ubicación de las zonas conservadas mostradas de color verde; y de color morado, la posición donde se diseñaron los iniciadores.....	54
Figura 23: Posición de los iniciadores simples en el gen UGT74B1 de <i>B. oleracea</i> var. Capitata. Se observa la ubicación de las zonas conservadas mostradas de color verde; y de color morado, la posición donde se diseñaron los iniciadores.....	55
Figura 24: Posición de los iniciadores degenerados de UGT74B1 en el gen completo de <i>B. oleracea</i> var. capitata. Se observa la ubicación de las zonas	

conservadas mostradas de color verde; y de color azul, la posición donde se diseñaron los iniciadores	56
Figura 25: Calidad en gel de agarosa del ADN obtenido en muestras de mashua, maca y brócoli	58
Figura 26: Amplificación del iniciador CYP79A2.1 en las muestras en estudio.....	61
Figura 27: Amplificación del iniciador CYP83B1.1 en las muestras en estudio	62
Figura 28: Amplificación del iniciador CYP83B1.2 en las muestras en estudio	62
Figura 29: Amplificación del iniciador CYP83B1.3 en las muestras en estudio	63
Figura 30: Amplificación del iniciador CYP83B1.4 en las muestras en estudio	63
Figura 31: Amplificación del iniciador CYP83B1.5 en las muestras en estudio	64
Figura 32: Árbol filogenético obtenido de las secuencias de genes de CYP83B1 por el método de máxima verosimilitud	65
Figura 33: Amplificación del iniciador SUR1.1 en las muestras en estudio.....	66
Figura 34: Amplificación del iniciador UGT74B1.1 en las muestras en estudio	67
Figura 35: Prueba de amplificación de los iniciadores CYP79A2.1d y CYP79A2.2d en una muestra de estudio de ambas especies.....	70
Figura 36: Amplificación del iniciador CYP83A1.1d en las muestras en estudio.....	71
Figura 37: Amplificación del iniciador CYP83A1.2d en las muestras en estudio.....	72
Figura 38: Amplificación del iniciador CYP83A1.3d en las muestras en estudio.....	72
Figura 39: Amplificación del iniciador CYP83A1.4d en las muestras en estudio.....	73
Figura 40: Amplificación del iniciador CYP83B1.1d en las muestras en estudio.....	74
Figura 41: Amplificación del iniciador CYP83B1.2d en las muestras en estudio.....	75
Figura 42: Amplificación del iniciador CYP83B1.3d en las muestras en estudio.....	75
Figura 43: Amplificación del iniciador CYP83B1.4d en las muestras en estudio.....	76
Figura 44: Amplificación del iniciador CYP83B1.5d en las muestras en estudio.....	77
Figura 45: Amplificación del iniciador CYP83B1.6d en las muestras en estudio.....	77
Figura 46: Amplificación del iniciador UGT74B1.1d en las muestras en estudio	78
Figura 47: Amplificación del iniciador UGT74B1.2d en las muestras en estudio	79

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1: Secuencia del gen CYP79A2 empleadas en los diferentes alineamientos	96
Anexo 2: Secuencia del gen CYP83A1 empleadas en los diferentes alineamientos	96
Anexo 3: Secuencia del gen CYP83B1 empleadas en los diferentes alineamientos	97
Anexo 4: Secuencia del gen SUR1 empleadas en los diferentes alineamientos	97
Anexo 5: Secuencia del gen UGT74B1 empleadas en los diferentes alineamientos	98
Anexo 6: Secuencia del gen ST5a empleadas en los diferentes alineamientos	98
Anexo 7: Soluciones empleadas en la extracción de ADN	99
Anexo 8: Soluciones empleadas en la electroforesis	100

RESUMEN

La mashua y la maca, son tubérculos andinos que poseen diversas propiedades, donde alguna de estas se le atribuye a los glucosinolatos. Existen tres tipos de glucosinolatos; los alifáticos, indólicos y aromáticos, siendo el de mayor proporción en estas especies los de tipo aromático. No se ha encontrado estudios moleculares de la biosíntesis de este compuesto, por lo que en la presente tesis mediante diseño de iniciadores y utilizando PCR se han amplificados fragmentos de ADN de genes que podrían estar participando en la síntesis de glucosinolatos aromáticos en mashua y maca, para de esta manera acercarnos al conocimiento de los genes de esta ruta en las especies mencionadas. Los pasos realizados fueron: 1) Búsqueda de genes e identificación de zonas conservadas, 2) diseño de iniciadores para fragmentos de genes y 3) amplificación mediante PCR utilizando los iniciadores diseñados. Como primer paso, se encontró secuencias nucleotídicas y aminoacídicas del orden Brassicales las cuales fueron alineadas, para localizar las zonas conservadas. Seguido de eso, se diseñaron iniciadores “simples” y degenerados a partir de las zonas conservadas tomando en cuenta las características del iniciador y su especificidad. Finalmente, se hizo una validación de los iniciadores, empleando como control positivo al Brócoli. Se obtuvo iniciadores simples y degenerados para los genes CYP79A2, CYP83A1, CYP83B1, SUR1 y UGT74B1. No todos los iniciadores amplificaron en el control, pero como mínimo un juego de iniciadores amplificó por gen, en el control y en muestras de maca. Sin embargo, en mashua, se obtuvo amplicones solo con los iniciadores degenerados, para el gen UGT74B1. Se concluye que la zona donde se diseñaron los iniciadores en maca, se encuentra conservado; sin embargo en mashua es más difícil predecir ya que las secuencias debieron haber sufrido más cambios en el transcurso de la evolución.

Palabras claves: Glucosinolato aromático, *Lepidium meyenii*, *Tropaeolum tuberosum*, zonas conservadas, cebadores.

ABSTRACT

The mashua and the maca, are Andean tubers that have various properties, which are usually attributed to glucosinolates. There are three types of glucosinolates; the aliphatic, indolic and aromatic being the one of greater proportion in these species those of aromatic type. No molecular studies of the biosynthesis of this compound have been found, so in the present thesis, using DNA primer design and using PCR, fragments of genes that could be involved in the synthesis of aromatic glucosinolates in Mashua and Maca have been amplified. The steps carried out were: 1) Search of genes and identification of conserved areas, 2) design of primers for gene fragments and 3) PCR amplification using the designed primers. As a first step, nucleotide and amino acid sequences of the Brassicales order were found, which were aligned to locate the conserved areas. Following that, "simple" and degenerated primers were designed from the conserved zones taking into account the characteristics of the primer and its specificity. Finally, a validation of the primers was made, using Broccoli as a positive control. Simple and degenerate primers were obtained for the CYP79A2, CYP83A1, CYP83B1, SUR1 and UGT74B1 genes. Not all the primers amplified in the control, but at least one set of primers amplified per gene, in the control and in maca samples. However, in mashua, amplicons were obtained only with the degenerate primers, for the UGT74B1 gen. It is concluded that the zone where the initiators were designed in maca, is conserved; however in Mashua it is more difficult to predict since the sequences must have undergone more changes in evolution.

Key words: Aromatic glucosinolate, *Lepidium meyenii*, *Tropaeolum tuberosum*, conserved zones, primers.

I. INTRODUCCIÓN

Los glucosinolatos (GSL) son metabolitos secundarios que se encuentran en especies de diferentes familias, y se caracterizan por contener un sulfato y un resto de tioglucosa en su estructura, que confiere diferentes propiedades benéficas para la salud humana y la planta que lo contiene (Wittstock y Halkier, 2002). La mashua y la maca contienen este metabolito, siendo los de mayor proporción los pertenecientes a la ruta de glucosinolatos aromáticos como: el 4-hidroxibenzil GSL (Glucosinalbin), bencil GSL (Glucotropaeolin) y m-metoxibencil GSL (Glucolimnathin) (Ortega *et al.*, 2006).

La biosíntesis de los glucosinolatos en las plantas se da en tres etapas: (A) Elongación de la cadena lateral (Met y Phe), (B) formación del núcleo de glucosinolato y (C) modificación de la cadena lateral. Estos compuestos se sintetizan a partir de diversos aminoácidos o de sus cadenas alargadas, siendo la metionina, triptófano y fenilalanina los precursores principales de la ruta de los glucosinolatos alifáticos, indólicos y aromáticos respectivamente (Halkier y Du, 1997; Grubb y Abel, 2006). Su función biológica se observa cuando existe un daño en la planta, los glucosinolatos entran en contacto con enzimas llamadas mirosinasas y dan como productos a los nitrilos, epitionitrilos, isotiocianatos, tiocianatos, entre otros, siendo el último producto mencionado el que brinda propiedades: anticancerígenas (Pledge-Tracy *et al.*, 2007), protección contra insectos y hongos necrotróficos que afectan los cultivos (Buxdorf *et al.*, 2013). Por otro lado, también generan efectos antinutricionales, como retraso del crecimiento, el cual es causado por el consumo excesivo de alimentos que presentan glucosinolatos (Wittstock y Halkier, 2002).

La mashua (*Tropaeolum tuberosum*), es un cultivo andino que ha sido utilizado por algunos campesinos para resolver problemas urinarios, enfermedades de la próstata, gonorrea y el riñón (Espinosa *et al.*, 1996); también, actúa protegiendo a otros cultivos

como la papa contra *Spongospora subterranea* conocida como sarna polvorosa de la papa (Arias, 2011). Pero, a pesar de las propiedades benéficas que presenta es consumida

generalmente por los campesinos, en las comunidades rurales; sin embargo, a nivel nacional y en otros países como Bolivia, Ecuador y Colombia, tiene poca importancia económica ya que no es muy valorada en el mercado (Boletín de información estadística agraria, 2012; Aruquipa *et al.*, 2016; Morillo *et al.*, 2016).

La maca, cultivo endémico del Perú, es una especie bastante estudiada y aprovechada en muchas partes del mundo, debido a que presenta propiedades nutricionales y medicinales que son empleados para el tratamiento contra el cáncer, impotencia, disfunción sexual, síntomas de la menopausia, desordenes menstruales, entre otros. Dichas propiedades varían dependiendo del ecotipo de la raíz y del medio en el cual se desarrolla; así mismo, se ha demostrado que presenta 100 veces mayor concentración de glucosinolatos que otras especies (Li *et al.*, 2001).

Tanto mashua como maca tienen estudios fitoquímicos y otros que determinan sus efectos tóxicos y medicinales en animales de laboratorio; sin embargo, no presentan estudios genéticos sobre la biosíntesis de glucosinolatos, faltando identificar los genes que participan en la ruta biosintética de glucosinolatos aromáticos. Es por ello que la presente investigación se pretende dar un aporte al conocimiento de la ruta mencionada. Esta investigación tiene como objetivo principal: Proponer iniciadores que identifiquen fragmentos de ADN de genes que intervienen en la ruta biosintética de glucosinolatos aromáticos en genotipos de *Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pavón “mashua” y *Lepidium meyenii* Walp “maca” y objetivos específicos: Búsqueda y alineamiento de secuencias homólogas de genes de la ruta biosintética de glucosinolatos aromáticos e identificación de zonas conservadas, diseño de iniciadores para fragmentos de genes que participan en la ruta biosintética de glucosinolatos aromáticos y verificación de los iniciadores diseñados en genotipos de mashua y maca.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. *Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pavón “MASHUA”

2.1.1. Generalidades y clasificación taxonómica

Tropaeolum tuberosum, es conocido por sus nombres comunes como “mashua” (Perú) “cubio” (Colombia), “isaño” (Bolivia), entre otros menos conocidos. Esta especie tanto silvestre como cultivado se encuentra en los Andes altos desde Colombia hasta el noreste de Argentina, donde los sectores más adecuados para su cultivo se encuentran desde los 2400 hasta los 3700 msnm, con mayor concentración en las regiones Suni y Puna baja de Perú y Bolivia (Arteaga, 2009; Grau *et al.*, 2003). Aún falta realizar más estudio para identificar un área más específica como el probable centro de origen de este cultivo (Grau *et al.*, 2003).

Clasificación taxonómica (ITIS, 2011)

Reino	: Plantae
Subreino	: Viridiplantae
Infrareino	: Streptophyta
Superdivisión	: Embryophyta
División	: Tracheophyta
Subdivisión	: Spermatophytina
Clase	: Magnoliopsida
Superorden	: Rosanae
Orden	: Brassicales
Familia	: Tropaeolaceae
Género	: <i>Tropaeolum</i> L.
Especie	: <i>Tropaeolum tuberosum</i> Ruiz & Pavón

La mashua se encuentra en el orden Brassicales dentro de la familia Tropaeolaceae; que comprende tres géneros, siendo *Tropaeolum* de distribución andina, y los géneros *Magallana* y *Trophaeastrum* endémicos de la Patagonia (Laboratorio de sistemática de plantas vasculares, 2013). Dentro de esta familia, *Tropaeolum* es el género más grande con 86 especies (Sparre y Andersson, 1991 reportado por Grau *et al.*, 2003), además la especie de *Tropaeolum tuberosum* presenta dos subespecies que son el *T. tuberosum* ssp. *Tuberosum*, que es la especie cultivada, y el *T. tuberosum* ssp. *Silvestre* que como su nombre lo indica es una especie silvestre, que se diferencia de la cultivada por la falta de tubérculos (Grau *et al.*, 2003).

2.1.2. Propiedades y usos del cultivo de mashua

Debido a los glucosinolatos, la mashua presenta propiedades biofumigantes la cual es empleada para proteger a los cultivos de papa contra *Spongospora subterranea* (Arias, 2011); y participa en el control del nemátodo *Meloidogine incognita* (Zavaleta-Mejía, 2000). El cultivo de mashua también es usado por algunos campesinos para resolver los problemas urinarios, enfermedades de la próstata, como también para aliviar la gonorrea (Espinosa *et al.*, 1996). En animales de laboratorio se ha observado una reducción de la movilidad espermática, producción diaria de esperma y los valores de la concentración durante la espermatogénesis; el cual apoya a la supuesta propiedad más conocida de que el cultivo suprime el apetito sexual y disminuye el potencial reproductivo y la función eréctil en los hombres (Grau *et al.*, 2003; Cárdenas-Valencia *et al.*, 2008; Vásquez *et al.*, 2012). También se ha demostrado su efecto antioxidante, y faltan más estudios que ayuden a determinar efectos en la concentración y/o memoria (Cruz *et al.*, 2017).

La parte comestible de la mashua contiene isotiocianatos los cuales le confieren al tubérculo un sabor picante no agradable para el consumo en crudo. Esta característica disminuye cuando es sometido a ebullición o secado al sol. En la ebullición los isotiocianatos se hidrolizan y se elimina el cianuro mejorando el sabor, y de esta manera puede ser empleado en guisos, sopas u otros platos (Cortés 1981, citado por Grau *et al.*, 2003). La exposición al sol, aumenta el dulzor del tubérculo y reduce los niveles del cianuro antes de cocinar (Dolores and Espín 1997, citado por Grau *et al.*, 2003).

Este cultivo tiene una serie de atributos positivos como rusticidad, tolerancia a plagas y alto rendimiento con bajos niveles de insumos (Arteaga, 2009). En parcelas experimentales se observa que la mashua es un cultivo muy productivo (en base al peso fresco), teniendo rendimientos que supera las 30 ton/ha. Sin embargo a nivel comercial solo se alcanza de 5 – 10 ton/ha de rendimiento (Vimos 1987 y Romeo *et al.*, 1989 citado por Grau *et al.*, 2003). Esta diferencia puede ser debido a que las parcelas de prueba no son lo suficientemente grandes para compararse con los rendimientos agrícolas reales (Grau *et al.*, 2003). Los rendimientos de mashua en campo, también pueden disminuir (con respecto a los experimental) debido a que no se encuentra en las mejores condiciones climática, y quizá no tengan los cuidados necesarios para su óptimo desarrollo, ya que por lo general es un cultivo que se siembra cerca de otros cultivos andinos como papa, olluco y oca, para protegerlos (Gómez *et al.*, 2000).

Según el Ministerio de Agricultura, a nivel nacional, el rendimiento anual obtenido entre los años 2000-2016 se han encontrado dentro de 5.2-6.8 ton/ha. En la provincia de Puno su rendimiento se encuentra dentro del rango de 6,175kg/ha y 7,447kg/ha, a comparación de la papa que desde el año 2000 ha alcanzado rendimiento mayores de 8,456.60kg/ha (Boletín de información estadística agraria, 2012); no hay valores de productividad que ayuden a comparar si estos rendimientos altos en papa se deben a los insumos empleados para su mejor crecimiento. Según el Ministerio de Agricultura, a nivel nacional, el rendimiento anual obtenido entre los años 2000-2016 se han encontrado dentro de 5.2-6.8 ton/ha.

En Bolivia y Colombia, es considerado un alimento que carece de importancia económica, por ello su cultivo se da en pequeñas cantidades que solo abastecen a los propios agricultores (Aruquipa *et al.*, 2016; Castañeda s.f.; Morillo *et al.*, 2016). En Puno, no se promueve su cultivo por no ser un producto de primera necesidad (Boletín de información estadística agraria, 2012). A pesar de las propiedades benéficas para la salud que presenta, la mashua es poco cultivada; y según los resultados de producción obtenidos en el MINAGRI, en 13 años (2003-2016) la producción en el Perú fue de 37,088-33,098ton respectivamente, lo que nos podría dar una idea de que el cultivo no ha aumentado su demanda en nuestro país.

Según Ortega *et al.* (2006), en las accesiones del Cusco estudiadas, los glucosinolatos presentes en el tubérculo de mashua son principalmente aromáticos como: el 4-hidroxibenzil GSL (Glucosinalbin), benzil GSL (Glucotropaeolin) y m-metoxibencil GSL (Glucolimnathin); de estos, los dos últimos forman los tiocianatos y el m-metoxibencil GSL fue el metabolito de mayor concentración (Figura 3). Además, descartó cualquier asociación del color oscuro del tubérculo y su característica silvestre con el mayor contenido de glucosinolatos, ya que la mashua con el mayor contenido de este metabolito se encontró en una accesión cultivada de piel naranja y pulpa amarilla de la zona de Sayllafaya (Cusco), seguido por una mashua silvestres de piel amarilla con pulpa blanca.

2.1.3. Estudios genético molecular

A nivel molecular, se han realizado estudios de caracterización mediante marcadores moleculares como SRAP (Ortega *et al.*, 2006), AFLP (Alagón y Rosas, 2009; citado por Quispe, 2012), SSR (Huamani, 2009) y RAPDs (Ortega, 2000; Quispe, 2012) llevados a cabo en accesiones de distintas localidades del Cusco, obteniendo como resultado alta variabilidad y diferencias entre los análisis morfológicos y moleculares según Ortega. Por otro lado, no se han encontrado estudios relacionados a los genes que participan en la ruta biosintética de glucosinolatos en mashua.

Se han realizado estudios con respecto al número de cromosomas y aun no se ha llegado a una conclusión sobre su número y nivel de ploidía, sin embargo, varios autores coinciden que las formas cultivadas son tetraploides $2n=4x=52$ con un número básico de $x=13$ (Cadima, 2006). En estudios recopilados por Grau *et al.* (2003), se encuentran propuestas menos frecuentes de su número cromosómico que son $2n: 42, 43, 48, 51$ y 64 ; además, en accesiones de mashua cultivadas en Perú; también se encontró niveles de ploidía de $2n=18, 27$ y 36 cromosomas, con numero básico de $x=9$ (Grau *et al.*, 2003). Estos resultados confirman la poliploidía de la mashua, sin embargo, todavía existen dudas sobre el numero cromosómico de esta especie, y puede ser debido a factores como la presencia de dos subespecies, altos niveles de ploidía, hibridación, y reproducción sexual y asexual que presenta este cultivo (Grau *et al.*, 2003). Se propuso que mashua es una especie autopoliplóide, aunque otros autores no descartan la

alopoliploidía segmentaria con una especie estrechamente relacionada como es *Tropaeolum cochabambae* (Grau *et al.*, 2003).

2.2. *Lepidium meyenii* Walp. “MACA”

2.2.1. Generalidades y clasificación taxonómica

La maca es una especie endémica del Perú, específicamente de Junín, de la Meseta de Bombóm (INIA, 2006). Actualmente su distribución abarca los Andes centrales de Perú, Bolivia y noroeste de Argentina. El área de cultivo de mayor extensión se encuentra en los alrededores del lago Junín, en las zonas de Huayre, Carhuamayo, Uco, Ondores, Junin, Ninacaca y Vicco (Dostert *et al.*, 2009).

En 1990, Gloria Chacón diferenció una especie de maca con *Lepidium meyenii* Walp. y la llamó *Lepidium peruvianum* Chacon; generando así una nueva especie perteneciente a la familia *Brassicaceae*; sin embargo, años después, Brack Egg (1999) reportó a ambas como una sola especie. En la actualidad el nombre aceptado para la maca es *Lepidium meyenii* Walp. Siendo su sinónimo *L. peruvianum* Chacón (Flores, 2016).

Clasificación taxonómica (ITIS, 2011)

Reino	: Plantae
Subreino	: Viridiplantae
Infrareino	: Streptophyta
Superdivisión	: Embryophyta
División	: Tracheophyta
Subdivisión	: Spermatophytina
Clase	: Magnoliopsida
Superorden	: Rosanae
Orden	: Brassicales
Familia	: Brassicaceae
Género	: <i>Lepidium</i> L.
Especie	: <i>Lepidium meyenii</i> Walp.

La maca es una planta bianual, es decir, presenta un ciclo vegetativo el cual da origen al hipocótilo; y un ciclo reproductivo donde se producen las semillas a partir del hipocótilo trasplantado (INIA, 2006). Esta raíz varía dependiendo de su color y presenta diferentes ecotipos que son: blanca, amarilla, roja y negra. Los ecotipos a su vez varían en sus propiedades, dependiendo del medio en el que se desarrolla (Castaño, 2008).

2.2.2. Propiedades y usos del cultivo de maca

La parte comestible es el hipocótilo el cual es consumido en forma fresca y seca; y también procesado como harina, cápsulas, pastillas, bebidas alcohólicas, mayonesa y tónicos. Cabe señalar que, de todos los productos elaborados a partir de maca se ha encontrado concentraciones altas de glucosinolatos en hipocótilos frescos, trazas en la mayonesa y ausencia en los licores y tónicos (Li *et al.*, 2001).

La maca es una especie con propiedades nutricionales que presenta 18 aminoácidos, de los cuales 7 son esenciales; además, cuenta con altas concentraciones de potasio, calcio y hierro, vitaminas como niacina y en menor proporción tiamina, riboflavina y vitamina C. También presenta propiedades medicinales que son empleados en el tratamiento contra el cáncer, pérdida de la memoria (Rubio *et al.*, 2011), síntomas de la menopausia (Leiva-Revilla *et al.*, 2014), impotencia, disfunción sexual (Zenico *et al.*, 2008), mejora la fertilidad (Uchiyama *et al.*, 2013) y mejora la producción de espermias (Yucra *et al.*, 2008), tiene efecto energizante, anti estrés (López-Fando *et al.*, 2004), antidepresivo (Ai *et al.*, 2014), además reduce la fatiga (Hye *et al.*, 2012), tiene actividad antiviral (Valle *et al.*, 2014), efectos protectores sobre la arquitectura ósea (Gonzales *et al.*, 2010), también podría aplicarse como un posible neuroprotector (Pino-Figueroa *et al.*, 2010), entre otras propiedades.

Las propiedades y sus efectos dependen del ecotipo de maca, por ejemplo, el ecotipo amarillo puede ser empleado para el tratamiento del cáncer al cérvix y colon, ya que su extracto metanólico presenta un efecto citotóxico sobre las líneas celulares HeLa y HT-29, siendo el efecto superior a los ecotipos morado y negro; esta característica se debe al contenido de glucosinolatos que en los mamíferos promueve la producción de enzimas de fase II de detoxificación y antocianinas con propiedades antiangiogénica,

antioxidante y anticarcinogénica (Alzamora *et al*, 2007). Por su parte, se ha encontrado que en ratones la maca negra aumenta el número de espermatozoides (Gonzales *et al*, 2006) y no afecta los niveles séricos de hormonas reproductivas en hombres, por lo tanto, su alto consumo no produciría cáncer a la próstata que generalmente se da cuando los niveles de testosterona sobrepasan lo normal (Gonzales *et al*, 2003). Se sugiere que las propiedades para mejorar la fertilidad puede deberse a la presencia de isotiocianatos aromáticos biológicamente activos, y específicamente debido al bencilo y m-metoxibencilo isotiocianatos (Johns, 1981).

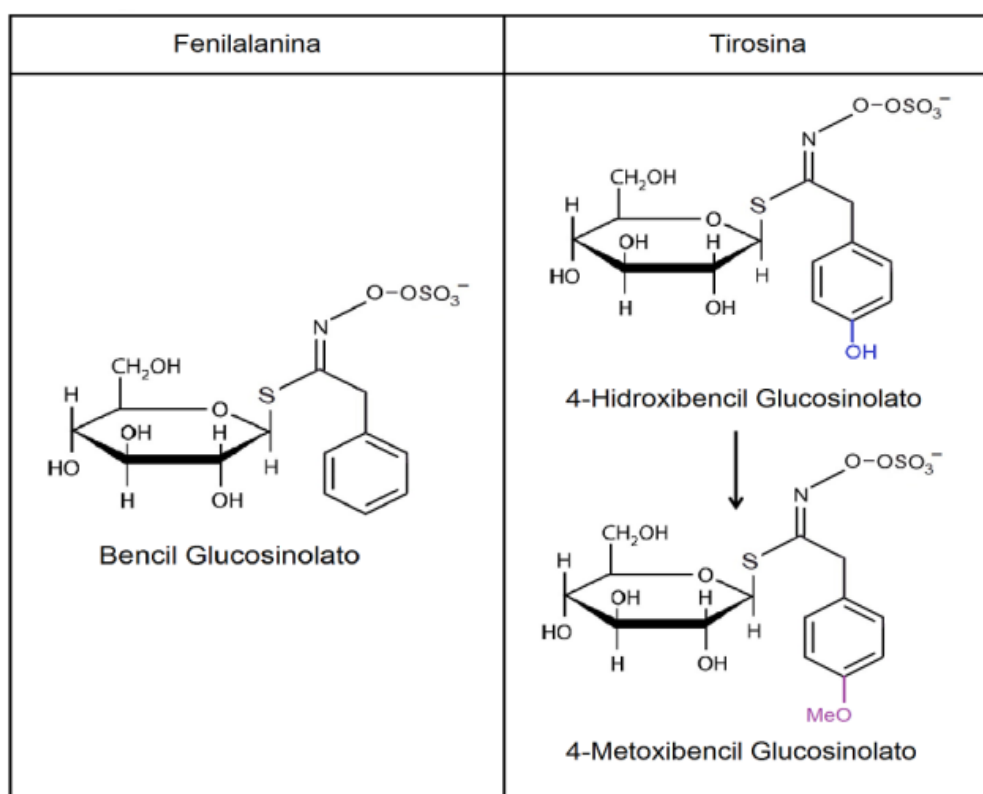


Figura 1. Glucosinolatos aromáticos encontrados en mayor proporción en mashua y maca.

FUENTE: (Ortega *et al.*, 2006).

El contenido de glucosinolatos en maca es aproximadamente 100 veces mayor que en otras especies de la familia Brassicacea (Li *et al.*, 2001). En este cultivo se ha encontrado nueve glucosinolatos, la mayoría de los cuales contienen núcleos aromáticos (Castaño, 2008). Los glucosinolatos que se encuentran en mayor proporción en hipocótilos y hojas frescas son bencilglucosinolato (Glucotropaeolin) y m-

metoxibencilglucosinolato, que pertenecen al grupo de los aromáticos (Dini *et al.*, 2002) (Figura 1). Estos y los isotiocianatos derivados, son los compuestos responsables del sabor picante y peculiar de la maca, que no es aceptable para algunas personas.

2.2.3. Estudios genético molecular

Quirós *et al.*, (1996), en una inspección de 10 células madres de polen aproximadamente, se determinó que la maca es un poliploide disómico, ya que los cromosomas se asocian en pares formando bivalentes. Además, para esta especie, se determinó un número cromosómico de $2n=8x$ con un número básico de $x=8$.

A nivel molecular se encuentran estudios de caracterización con marcadores como AFLP (Ponce *et al.*, 2010), RAPD (Toledo *et al.*, 1998), entre otros. Sin embargo, no se ha encontrado estudios moleculares con respecto a los genes que participan en la ruta de biosíntesis de glucosinolatos aromáticos.

2.3. GLUCOSINOLATOS

2.3.1. Generalidades de los glucosinolatos

Los glucosinolatos pertenecen a uno de los mayores grupos de metabolitos secundarios de plantas que están compuestos por un núcleo común, constituido por una β -D-tioglucoosa unido a un resto sulfonado de aldoxima y una cadena lateral variable derivada de aminoácidos (Figura 2).

Se ha encontrado en 16 familias de angiospermas, de los cuales 10 pertenecen al orden Brassicales (conocido también como Capparales) (Fahey *et al.*, 2001). La familia que presenta mayor contenido de este metabolito es la familia Brassicaceae (Wittstock y Halkier, 2002).

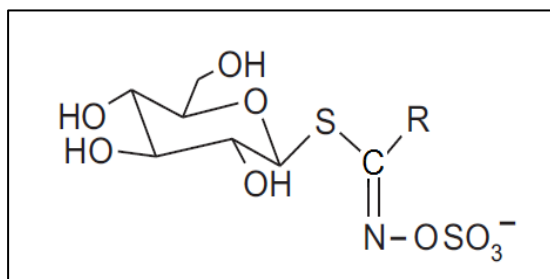


Figura 2. Estructura del glucosinolato.

FUENTE: (Redovnikovic *et al.*, 2008)

Este compuesto se sintetiza a partir de diversos aminoácidos o sus cadenas alargadas, dando como resultado tres clases de glucosinolatos: los alifáticos, aromáticos e indólicos (Redovnikovic *et al.*, 2008) (Tabla 1). La biosíntesis de glucosinolatos se realiza en tres etapas: (A) Elongación de la cadena lateral, (B) formación de la estructura del núcleo de glucosinolato y (C) modificación de la cadena lateral secundaria (Wittstock y Halkier, 2002). Cabe señalar que la primera etapa solo se da para los aminoácidos: metionina y fenilalanina (Sonderby *et al.* 2010).

Hasta el año 2011 se documentaron alrededor de 132 estructuras de glucosinolatos en la naturaleza (Agerbirk y Olsen, 2012). El origen de esta diversidad estructural se debe a las modificaciones que suceden en dos puntos de la biosíntesis; la primera ocurre en la elongación de la cadena lateral de los aminoácidos precursores, y la segunda en las modificaciones secundarias, incluyendo la oxidación, desaturación, hidroxilación, metoxilación, sulfatación y la glicosilación (Redovnikovic *et al.*, 2008; Grubb y Abel, 2006).

Tabla 1: tipos de glucosinolatos y sus respectivos aminoácidos precursores

Tipo de glucosinolato	Aminoácido precursor
G. aromático	fenilalanina y tirosina
G. alifático	Metionina, isoleucina, leucina, Alanina y valina
G. indólicos	Triptófano

Koroleva *et al.* (2000) realizó un estudio en el tallo de la flor de Arabidopsis, donde a las células que almacenan glucosinolatos denominó células S, estas se ubican entre la

endodermis y las células pertenecientes al haz vascular, y fueron identificadas por microanálisis de rayos X. Este metabolito es transportado largas distancias a través del floema (Chen *et al.*, 2001).

Las mirosinasas que son las enzimas que degradan el glucosinolato, se encuentran contenidas en células llamadas mirosin. Bones e Iversen (1985), observaron en las plántulas jóvenes, la distribución de la célula mirosin en el tejido diferenciado, estas células fueron identificadas por tinción y usando microscopía de luz. Bones *et al.*, (1991), identificaron a las células mirosin en plántulas, por medio de marcaje con anticuerpos monoclonales producidos para la mirosinasa (immunolocalización); estas fueron localizadas en todos los órganos y también en el tejido vascular, encontrándose en una mayor proporción en la zona marginal, tanto en las radículas como en el hipocótilo. Husebye *et al.*, (2002) localizó a la célula mirosin en las células guardianes y células del floema presentes en el tallo, hoja caulinar, pedúnculo, gineceo, saco de polen, sépalo y silicua, en todas las etapas de desarrollo de la planta de *Arabidopsis*.

Cuando existe un daño en la planta, las mirosinasas, entran en contacto con los glucosinolatos, y da productos diferentes como: isotiocianatos, tiocianatos y nitrilos (Halkier y Gershenzon, 2006; Redovnikovic *et al.*, 2008; Kucherning *et al.*, 2012).

Los productos de la hidrólisis del glucosinolato dan a las plantas propiedades como: defensa química ante herbívoros y otros patógenos (Buxdorf *et al.*; 2013), aunque no todos los herbívoros son sensibles a estos productos. Existen áfidos que han desarrollado una defensa ante el sistema glucosinolato-mirosinasa, y usan plantas que contienen glucosinolato como huéspedes, causando pérdidas agronómicas en los cultivos (Winde y Wittstock, 2011).

En mamíferos y humanos los isotiocianatos que ingresan por medio de la alimentación, se absorben pasivamente en las células epiteliales y se conjugan con glutatión tan pronto como ingresan a las células. Estos conjugados se transportan activamente fuera de la célula para ser eliminados por los riñones (Traka y Mithen, 2009, citado por Winde y Wittstock, 2011). En el caso de los insectos que se alimentan de plantas que contienen

glucosinolatos, se espera que tengan mecanismos eficientes para no ser dañados por la descomposición de este metabolito, sin embargo, aún faltan pruebas concluyentes que demuestren que realizan algún tipo de conjugación al igual que en los humanos y mamíferos.

Algunos áfidos engañan al sistema glucosinato-mirosinasa en el modo de alimentación, ya que evitan dañar a las células rodeadas por el floema, evitando así que se active el sistema de defensa (Winde y Wittstock, 2011). Al parecer el áfido, *Brevicoryne brassicae*, ingiere los glucosinolatos intactos y los secuestra; además, también posee su propia mirosinasa que es almacenada por separado en microcuerpos cristalinos almacenándolos en la hemolinfa para su propia defensa (Kazana *et al.*, 2007 citado por Winde y Wittstock, 2011). En el caso de la polilla de alas de diamante, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: *Plutellidae*), se protege de los productos tóxicos que provienen de la degradación de glucosinolatos, convirtiendo estos a desulfoglucosinolatos que no son sustratos para mirosinasas, gracias a una enzima que se encuentra en el intestino de la larva, llamada sulfatasa. Finalmente el producto formado es excretado con las heces (Ratzka *et al.*, 2002).

Los glucosinolatos también son señal de alimentación a distancia para algunos insectos herbívoros, en los cuales, el 4-hidroxibencil GSL y bencil GSL (glucosinolatos aromáticos), son los preferidos por los insectos (Mewis *et al.*, 2002). La mostaza (*S. alba*), contiene altas concentraciones de estos compuestos aromáticos con los que atrae a las hembras de *Hellula undalis* y la estimula para la oviposición. No obstante, el 4-hidroxibencil GSL, a la vez le da resistencia ante otros insectos como *Phyllotreta cruciferae* y *Mamestra configurata* Walker, y hace de esta planta un huésped pobre para el escarabajo de polen *Meligethes aeneus* (Bodnaryk 1999, citado por Mewis *et al.*, 2002).

Los productos del glucosinato también tienen beneficios para la salud humana, por ejemplo, los glucosinolatos aromáticos disminuyen el riesgo de ataque al corazón, debido a su actividad antiinflamatoria (Vo *et al.*, 2013). El isotiocianato, es un producto anti cancerígeno que inhibe tumores mamarios (Pledge-Tracy *et al.*, 2007) y disminuye el riesgo de cáncer al hígado (Prochaska *et al.*, 1992).

Por lo tanto, para aprovechar al máximo las propiedades a nivel nutricional durante su consumo, se deben tener algunas consideraciones que ayudaran a mantener la estabilidad del compuesto. Por ejemplo, en el caso del brócoli es recomendable realizar la cocción a vapor para evitar las modificaciones desfavorables de los glucosinolatos indólicos y alifáticos totales; además, se debe tener en cuenta que los glucosinolatos indólicos son más termolábiles que los alifáticos a temperaturas altas (Oerlemans *et al.*, 2006). Las condiciones de cultivo también son importantes, como en el brócoli, en el que la cantidad de glucosinolatos totales aumenta al someterlo a una alta concentración de NaCl (100 mM) mejorando así, el valor nutricional de los alimentos (Yuan *et al.*, 2010).

No todos los productos obtenidos de la degradación de glucosinolatos son beneficiosos, por ejemplo, la 5-viniloxazolidina-2-tiona y la 2-hidroxi-3-butenil son glucosinolatos que se encuentran en un gran porcentaje en las semillas de colza, producen un efecto bociogénico en los animales (Redovnikovic *et al.*, 2008).

El estudio de estos metabolitos es bastante amplio, sin embargo, las investigaciones en la biosíntesis de glucosinolatos a nivel molecular solo se han realizado en *Arabidopsis thaliana* (Dalgaard *et al.*, 2003; Field *et al.*, 2004; Smolen y Bender, 2002; Naur *et al.*, 2003), *Brassica rapa* (Yang *et al.*, 2010; Zang *et al.*, 2009), *Brassica oleracea* (Qiu *et al.*, 2009), *Raphanus sativus* (Hara *et al.*, 2000), *Barbarea vulgaris* (Liu *et al.*, 2016), entre otros pertenecientes a la familia Brassicaceae; además de que se conocen las secuencias de los genes que participan en la biosíntesis de este metabolito en *T. hassleriana* que pertenece a la familia Cleomaceae.

Huamani (2009), por medio de estudios bioinformáticos diseñó iniciadores para la amplificación de genes que participan en la biosíntesis y degradación de glucosinolatos basándose en el supuesto de que estos genes encontrados en la planta modelo *Arabidopsis thaliana* son semejantes a cultivos que acumulan glucosinolatos. Además, existe un estudio en la papa cv. Desire para mejorar su resistencia ante *Phytophthora infestans*, y a otros patógenos y plagas, que disminuyen la producción. En dicho trabajo, se introdujeron 3 genes de enzimas que participan en la etapa final de la biosíntesis de la

estructura base de los glucosinolatos: C-S lyasa (SUR1), glucosiltransferasa (GT) y sulfotransferasa (ST) (Gonzales, 2008).

2.3.2. Biosíntesis de los glucosinolatos aromáticos

La ruta de los glucosinolatos aromáticos es muy similar a la de los indólicos (Sonderby *et al.* 2010), y su biosíntesis esta dado por tres etapas: (A) Elongación del aminoácido, (B) formación del nucleo del glucosinolato y (C) modificación de la cadena lateral. Cabe señalar que la primera etapa solo se da en los aminoácidos de metionina y fenilalanina (Sonderby *et al.* 2010, Liu *et al.*, 2016).

2.3.2.1. Elongación del aminoácido

Esta primera etapa de biosíntesis consiste en la elongación de la cadena inicial del aminoácido. Para el aminoácido de metionina el proceso se inicia con una desaminación realizada por la enzima BCAT4 para formar el 2-oxo ácido, el cual ingresa al ciclo de elongación que consiste en una condensación realizada por la enzima MAM (metiltioalquil lactato sintasa); isomerización, por IPMI LSU (sub unidad grande isopropilmalato isomerasa) y IPMI SSU (subunidad pequeña isopropilmalato deshidrogenasa); y oxidación-descarboxilación por la IPMDH (isopropilmalato deshidrogenasa). Seguido de esto ocurre una segunda transaminación donde se produce la cadena elongada, en función de BCAT3, dando al producto final de esta etapa (Figura 3). Siguiendo como base los genes que participan en esta ruta, se diseñaron iniciadores para obtener los posible genes que participan en la etapa de elongación de los glucosinolatos aromáticos en la especie *Barbarea vulgaris*, donde se identificaron todos los genes anteriormente mencionados (Liu *et al.*, 2016).

La etapa de condensación es muy importante, ya que es el primer punto donde se genera la variación del glucosinolato; por ende, la familia MAM que participa en ese proceso cobra relevancia. En la ruta de los glucosinolatos alifáticos, participan la enzimas MAM1 y MAM3 las cuales presentan una alta homología entre ellas. En *A. thaliana* los genes que codifican a estas enzimas están compuestos por 10 exones en su estructura y

separados por 11.5kpb, presentan propiedades similares, pero la especificidad por sus sustratos son diferentes (Kroymann *et al.*, 2001).

En los glucosinolatos alifáticos, MAM1 cataliza la reacción de condensación en los tres primeros pasos dando como resultado cadenas cortas de hasta 3 grupos metilo, luego MAM3 incorpora hasta 6 grupos metileno. La afinidad de MAM3 por su sustrato es mayor, conforme aumentan los carbonos de la cadena elongada (Textor *et al.*, 2007). Según Textor *et al* (2007), las proteínas de MAM3 se localizan en los cloroplastos, por ello el 2 oxo-ácido debe ser transferido desde el citosol a este organelo para ser utilizado.

Sin embargo, en los glucosinolatos aromáticos presentes en la especie *Barbarea vulgaris*, se identificó solo una enzima MAM (Liu *et al.*, 2016). La enzima MAM, identificada por Liu *et al.*, (2016), requiere de más estudios para conocer su estructura, función, localización, afinidad, entre otros parámetros que se consideren relevantes.

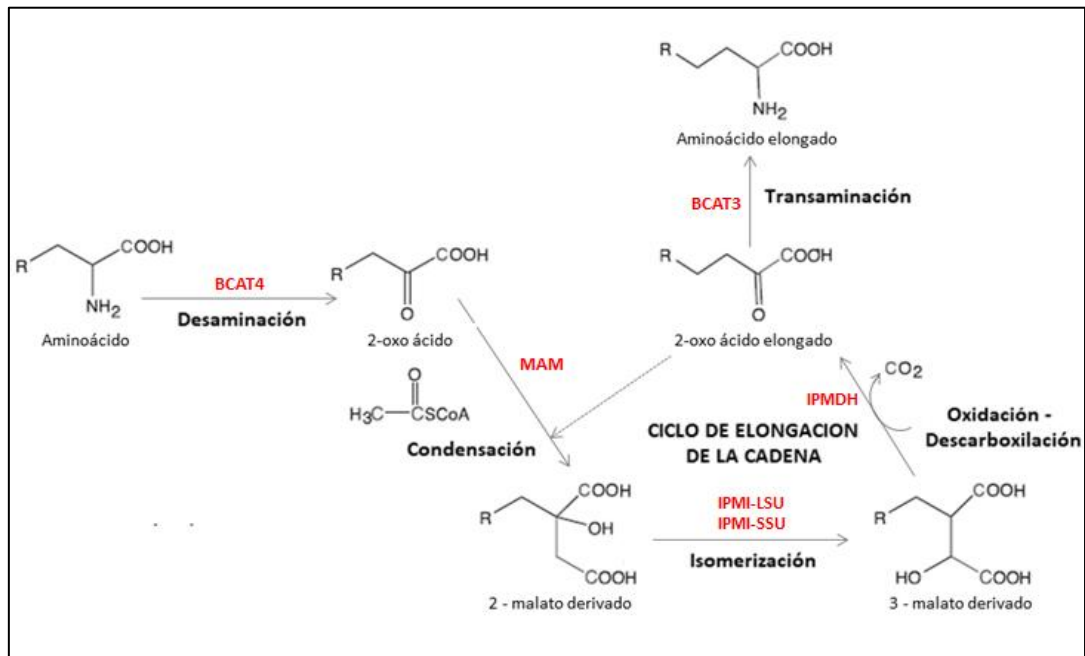


Figura 3. Elongación del aminoácido en la biosíntesis de glucosinolato aromático.

FUENTE: (Textor *et al.*, 2007)

2.3.2.2. Formación de la estructura del núcleo del glucosinolato

La primera enzima que participa en este paso de la biosíntesis es la Citocromo P450 79A2 (CYP79A2) que es dependiente del citocromo P450. Este gen posee solo un intrón que es característico de los citocromos de tipo A, aunque otros miembros de la familia CYP79 tienen uno o dos intrones adicionales (Wittstock y Halkier, 2000). Esta enzima participa en la formación de fenilacetaldoxima a partir de fenilalanina, y metaboliza de manera específica a este aminoácido, a pesar de que la L-tirosina y la L-homofenilalanina son estructuralmente similares y además son precursores de los aminoácidos aromáticos al igual que la fenilalanina (Wittstock y Halkier, 2000).

El segundo paso de la formación de la estructura del núcleo lo realizan otras enzimas que pertenecen a los citocromos P450, de la familia 83. CYP83B1 es la enzima que metaboliza de manera eficiente a las cadenas elongadas de fenilacetaldoxima; sin embargo, es necesario también la actividad de CYP83A1 para que el proceso sea efectivo (Naur *et al.*, 2003). Estas oxidan a las oximas, haciéndolas inestables y permiten así la reacción con los donadores de azufre siendo este último proceso catalizado por la enzima SUR1 (figura 1). Estas enzimas pueden ser inhibidas por la triptamina, o por un inhibidor más potente como la triptamina N-hidroxilo que se une firmemente al sitio activo (Grubb y Abel, 2006).

La siguiente enzima una C-S liasa, presenta una baja especificidad por su sustrato, por lo tanto es capaz de participar en las tres rutas de biosíntesis y cataliza múltiples reacciones. La S-alquil-tiohidroximato liasa, conocida también como rooty/superroot1 y SUR1, es una C-S liasa que participa en la biosíntesis de glucosinolatos proporcionando azufre que se incorpora en los grupos Fe-S de los complejos de proteínas fotosintéticas, dando como producto la fenilacetohidroximato (Munt *et al.*, 2013). Este gen presenta 7 exones en *Arabidopsis Thaliana* y 5 exones en *Brassica rapa* y *Brassica oleracea* (Yang *et al.*, 2010).

La enzima UDP-glucosiltransferasa 74B1 (UGT74B1) participa en la conversión de fenilacetohidroximato, insertando la glucosa que se encuentra en la UDP-D-glucosa

para obtener bencil-glucosinolato (Grubb *et al.*, 2004). Esta enzima no solo inserta glucosa a partir de la UDP-D-glucosa, sino lo podría hacer también a través de otros donantes de azúcar como UDP- α -D-galactosa y UDP- α -D-N-acetilglucosamina, aunque la efectividad de estas son mucho más bajas que la UDP-D-glucosa (Marroun *et al.*, 2016). También se evaluó la eficiencia de donadores de glucosa con UDP- α -D-acido glucurónico y GDP- α -D-manosa, los cuales se catalogaron de ineficientes por presentar menos del 5 por ciento de actividad relativa (Marroun *et al.*, 2016). La UGT74B1 es una enzima que presenta dos dominios de doblez de Rossmann, donde el sitio activo de esa enzima se visualiza como un canal largo entre los dos pliegues de Rossmann con dos regiones, una para cada ligando (Marroun *et al.*, 2016).

La Sulfotransferasa 5a (ST5a), también conocido como sulfotransferasa 16 (SOT16) es una enzima que pertenece a la superfamilia de las sulfotransferasas y participa en el último paso de esta etapa (Piotrowski *et al.*, 2004). La ST5a cataliza la transferencia del grupo sulfato a través de la 3-fosfoadenosin-5-fosfosulfato. Esta enzima presenta como sustrato a un desulfoglucosinolato, obteniendo como producto final de la reacción al bencilglucosinolato. Los primeros estudios cinéticos de esta enzima se determinaron en *Lepidium* (Glenden), aunque se le puede encontrar tanto en procariontas (se ubica en el citosol) como en eucariotas (Piotrowski *et al.*, 2004). Dependiendo de la especie pueden existir parálogos de este gen, por ejemplo, en *Brassica rapa* existen 2 parálogos de ST5a, nueve de ST5b y uno de ST5c que se encuentran en mayor proporción en los cromosomas 1 y 7; sin embargo, en *Arabidopsis* se encontraron 3 desulfoglucosinolato sulfotransferasas: ST5a, ST5b y ST5c (AtST5a, AtST5b y AtST5c respectivamente) ubicados en el cromosoma 1 (Zang *et al.*, 2009). AtST5a y AtST5b están reorganizados en forma de tándem, sin embargo la relación filogenética más estrecha se encuentra entre AtST5b y AtST5c (Piotrowski *et al.*, 2004). En *A. thaliana* y *B. rapa*, estos genes no presentan ningún intrón, además sus zonas codificantes tienen un porcentaje alto en homología, principalmente en las ST5a (Zang *et al.*, 2009). La enzima ST5a tiene una mayor afinidad por el triptófano y la fenilalanina, por ende en una situación competitiva prefiere a estos aminoácidos; sin embargo, la ST5b y ST5c participan en la biosíntesis de glucosinolatos alifáticos ya que prefieren a la metionina (Piotrowski *et al.*, 2004).

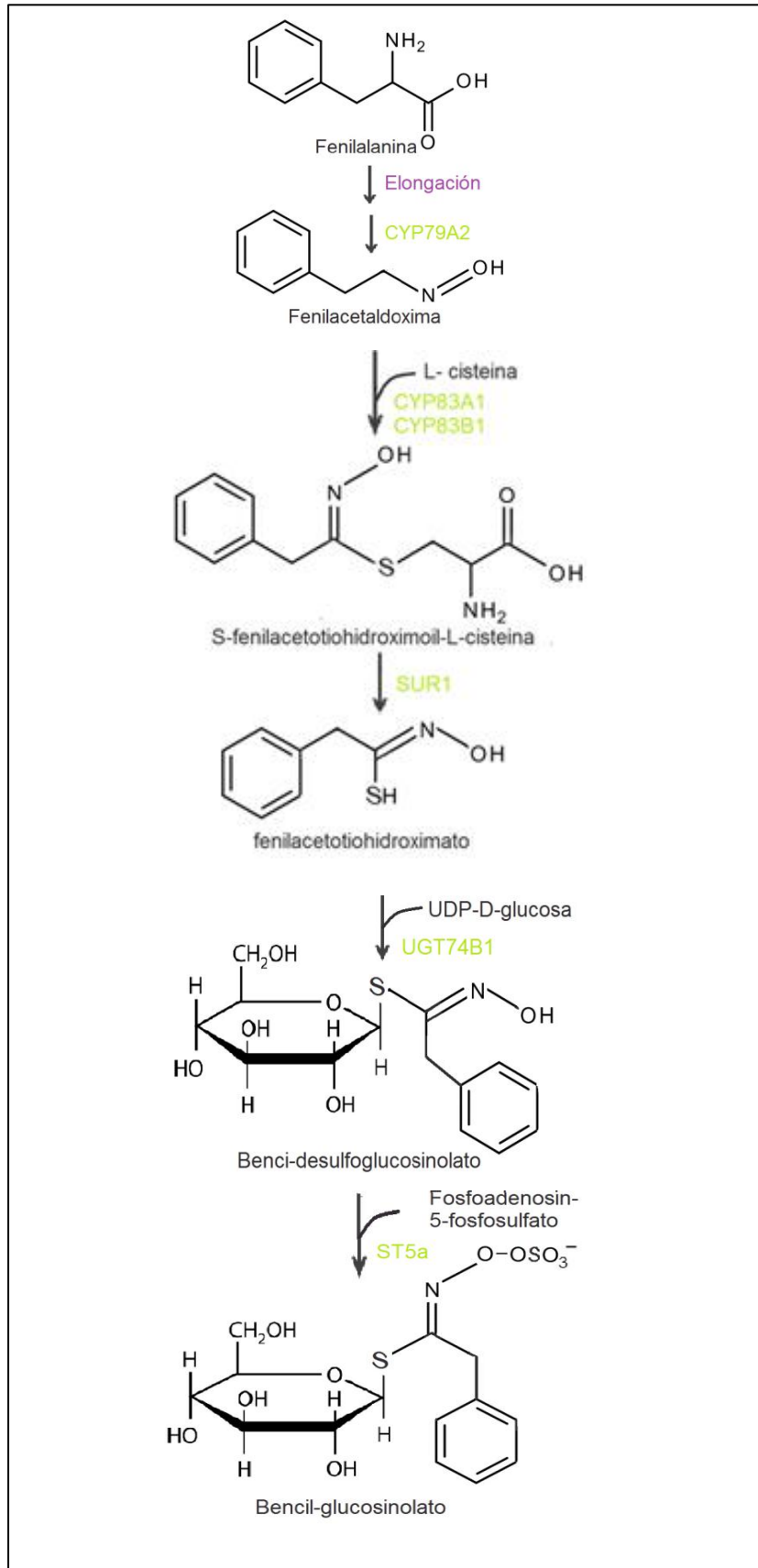


Figura 4. Ruta de los glucosinolatos aromáticos.

FUENTE: (Sonderby *et al.*, 2010)

2.3.2.3. Modificación de la cadena lateral de glucosinolato

En los glucosinolatos derivados de la metionina existen enzimas importantes que participan en esta etapa que son: FMO–GSOX (la flavin–glucosinolato monooxigenasa S–oxigenasa), AOP (producción de alquenal hidroxilado), GS–OH (proteína dependiente de Fe (II) de la superfamilia de la oxigenasa) y la CYP81F2.

Hasta hace dos años aproximadamente, se conocía solo los genes y enzimas que participaban en los glucosinolatos derivados de la metionina para esta etapa; sin embargo, el 2016 (Liu *et al.* 2016) se realizó las primeras investigaciones para darnos un alcance de la ruta biosintética de los glucosinolatos aromáticos en *B. vulgaris*. Liu *et al.*, (2016) realizó la búsqueda de los genes de glucosinolatos derivados de la homofenilalanina, basándose en el hipotético caso de que las enzimas que participan en la hidroxilación de los glucosinolatos derivados de la metionina serían los mismos. Se trabajó con dos tipos de *B. vulgaris*, el tipo P (susceptible a plagas) y el tipo G (resistente a plagas). En *B. vulgaris* de tipo P, se detectó una secuencia homóloga a CYP81F2 y GS-OH; y para el tipo G, se detectaron dos secuencias homólogas a FMO-GSOX y una secuencia para el gen GS-OH. No se detectó una secuencia homóloga al gen AOP en ninguna de las secuencias (Liu *et al.*, 2016).

2.4. BIOINFORMÁTICA

La bioinformática es el uso de técnicas para el análisis, interpretación y generación de datos biológicos (Medina *et al.*, 2012). Esta ciencia también se conoce como biología computacional y biocomputación que hacen referencia a campos de estudio interdisciplinarios muy vinculados, que requieren el uso o el desarrollo de diferentes técnicas que incluyen informática, matemática aplicada, estadística, ciencias de la computación, inteligencia artificial, química y bioquímica. Estas técnicas en conjunto ayudan a solucionar problemas, analizar datos, simular sistemas o mecanismos, todos ellos de índole biológica, y usualmente a nivel molecular (Mann, 1997).

El alineamiento múltiple de secuencias nucleotídicas y el diseño de iniciadores son técnicas desarrolladas por programas bioinformáticos, los cuales se emplearán en esta investigación. Dichos programas ayudan a resolver problemas mediante algoritmos, que son una secuencia de pasos no ambiguos que se pueden ejecutar en un tiempo finito.

2.4.1. Alineamiento múltiple de secuencias

Es una de las técnicas bioinformáticas más usadas ya que por medio de ella podemos realizar desde la filogenia hasta la búsqueda de motivos. El primer paso para realizar un alineamiento múltiple es contar con las secuencias en estudio, para luego introducirlas en el programa elegido y por medio de algoritmos obtener desde la búsqueda de motivos (zonas conservadas) hasta la filogenia de las secuencias en estudio (Pinzón, 2006).

Realizar una comparación de varias secuencias puede contemplarse simplemente como una extensión al problema de comparar dos secuencias entre sí. Sin embargo, realizar una búsqueda en una base de datos no resulta tan sencillo, y a medida que las bases de datos crecen hay que encontrar algoritmos de búsqueda que minimicen el tiempo necesario sin perder precisión en el resultado. Los programas FASTA y BLAST, son esencialmente métodos que buscan regiones cortas con emparejamientos idénticos y que puedan extenderse hasta, en el caso óptimo, construir un alineamiento total (Pallás, 2008).

Los algoritmos computacionales empleados en el alineamiento de secuencias son la programación dinámica, y métodos heurísticos o probabilísticos.

2.4.1.1. Programación dinámica:

Es un método para la resolución de problemas complejos desglosándolos en sub problemas que son más fáciles de resolver. Una vez resuelto estos sub problemas, se combinan las soluciones obtenidas para generar la solución del problema original (Sánchez, 2014).

2.4.1.2. Algoritmos heurísticos:

Es un método que permite encontrar una solución aproximada al problema, generalmente se usan cuando se pretende resolver un problema que computacionalmente es costoso, es decir, sacrifican la exactitud de la solución en favor del tiempo de respuesta (Rabasa y Santamaría., 2004). Se dividen en:

- **Alineamiento progresivo:** Consiste en emparejar las secuencias múltiples de manera heurística, por lo que la precisión de este alineamiento dependen de cuan relacionadas estén los emparejamientos iniciales. Luego se va incorporando el resto de las cadenas a razón del grado de similitud (Mora-Gutierrez *et al.*, 2011).
- **Alineamiento iterativo:** Este tipo de método intenta mejorar el alineamiento progresivo, optimizando los emparejamientos iniciales y haciéndolo esta vez de manera global. El proceso consiste en encontrar un alineamiento global inicial que luego se va perfeccionando a través de una serie de ciclos (iteraciones) hasta el punto donde no es posible realizar mejora (Mora-Gutierrez *et al.*, 2011).

Los programas empleados en la búsqueda de secuencias y alineamientos múltiples de secuencias son:

- **MAFFT:** Es un programa que se utiliza en diversas estrategias de alineación, siendo empleados para la alineación múltiple de secuencias nucleotídicas los métodos progresivos y de refinamiento iterativos (Katoh y Standley, 2013). Se puede tener acceso a este programa desde: <http://mafft.cbrc.jp/alignment/software/>
- **CLUSTAL X/W:** La manera cómo opera este programa es alineando progresivamente las secuencias (alineamiento global) en pares bajo el algoritmo de programación dinámica (Bazinnet, 2015 y Chenna R. *et al*; 2003). El programa está diseñado para realizar múltiples alineaciones, ver los resultados del proceso de alineación y si es necesario mejorarla (Pallás, 2008), el alineamiento se va

construyendo progresivamente por una serie de alineamientos bajo el orden de ramificación de un árbol guía que se construyó utilizando el método del vecino más cercano (Chenna R. *et al*; 2003). El formato de entrada a este programa es el FASTA que se distingue por el símbolo “>” que se antepone a los datos de la secuencia. Se puede obtener en <<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/index.html>>.

- **MEGA5:** El objetivo de MEGA5 es proporcionar un conjunto integrado de herramientas para el análisis estadístico de datos de ADN y secuencias de proteínas a partir de un punto de vista evolutivo. Es un software que alinea secuencias, reconstruye arboles filogenéticos y lo visualiza. La interfaz de este programa está diseñado para el uso fácil para de los principiantes y científicos experimentados (Tamura *et al.*, 2011). Está disponible de forma gratuita en <<http://www.megasoftware.net/>>.
- **BLAST:** El algoritmo de BLAST fue desarrollado para búsquedas de similitud de secuencias de ADN y proteínas. Usa un algoritmo heurístico que casi siempre funciona para encontrar secuencias relacionadas en una base de datos, también es capaz de calcular la significación de sus resultados. BLAST es muy conocido debido a su popularidad en la *World Wide Web* a través de un gran servidor en el Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) y en muchos otros sitios. Se puede acceder a este programa desde <<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>>.

2.4.2. Diseño de iniciadores *in silico*

El diseño de iniciadores *in silico* se realiza utilizando programas bioinformáticos, el cual dependerá del material genético que se está trabajando, y si los iniciadores a obtener son “simples” o degenerados.

Para seleccionar los iniciadores adecuados se debe tener en cuenta el tamaño del iniciador, la temperatura de fusión (T_m), el porcentaje de GC; datos que se pueden

analizar fácilmente considerando algunos parámetros generales para su diseño (Pinzon, 2006, Giorgio, s.f.):

El cuidadoso diseño de iniciadores es uno de los aspectos más importantes de la PCR, ya que cebadores mal diseñados nos podrían amplificar fragmentos no deseados o no obtener amplificados. Para evitar o reducir estos riesgos, se debe seguir algunas reglas que han demostrado ser útiles como (Pinzon, 2006):

- ✓ Longitud del iniciador: Cada iniciador debe tener de 18 a 30pb y en una pareja los cebadores no deben diferir por más de 3pb.
- ✓ Contenido de G+C debe ser alrededor de 40-60%.
- ✓ Temperatura de fusión (Tm): deseable entre 50-65°C, además la diferencia del par de iniciadores debe ser menor a 5°C.
- ✓ Las terminaciones 3' no deben ser complementarias, ya que esto puede llevar a la formación de dímeros, debido a que los cebadores están presentes en una concentración elevada en la PCR. La naturaleza de ese extremo es crucial, por lo que se recomienda que debe empezar con G o C.
- ✓ Evitar regiones autocomplementarias de más de 3pb que podrían formar estructuras secundarias internas (horquillas).
- ✓ Evitar 4 o más G o C en el extremo 3' del iniciador.
- ✓ La repetición de di-nucleótidos en forma consecutiva debe evitarse, como máximo se puede permitir dentro de un oligo 4 di-nucleótidos repetidos.
- ✓ Se puede agregar degeneraciones en algunas posiciones del cebador, teniendo en cuenta que se incrementa el riesgo de amplificación inespecífica. Para la codificación de los nucleótidos degenerados se debe tener en cuenta el código IUPAC/IUB.

A o G = R	A o T = W	C o G = S	C o T = Y	A o C = M	C, G, T o A = N
G o T = K	A, C o T = H	C, G o T = B	A, G o T = D	A, C o G = V	“.” o “-“ = gap

Los iniciadores “simples” y degenerados se pueden diseñar de forma empleando solo programas básicos como el BLAST, programas que faciliten la alineación de las

secuencias en estudio y un programa de diseño de iniciadores como el *Primer3plus* (Comunicaciones libres, 2013).

- ***Primer3Plus***: El *Primer3Plus* es una interfaz web para el *primer3*, que permite una mayor comprensión para los usuarios ocasionales, y a su vez sea de gran alcance para los usuarios más experimentados que necesitan realizar tareas más complejas o laboriosas. Se puede distinguir 5 escenarios distintos para el diseño de iniciadores que son: la detección, clonación, secuenciación, primer registro y lista de primer. La detección se puede utilizar para el diseño de iniciadores de PCR estándar o oligos de hibridación que detectan una secuencia (Untergasser *et al.*, 2007). Para ellos se considera como criterios: temperatura de fusión de oligonucleótidos, tamaño, contenido de GC, posibilidades de dímeros de cebadores, tamaño del producto de PCR, posición dentro de la secuencia de origen (plantilla), entre muchas otras restricciones. Este programa se encuentra disponible en: <<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi/>>.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. LUGAR DE EJECUCIÓN

El presente trabajo de investigación se realizó en los laboratorios de biología molecular del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Agraria la Molina.

3.2. MATERIAL VEGETAL

Las semilla vegetativas de mashua fueron adquiridas en el mercado “San francisco” ubicado en Villa María del Triunfo, se obtuvieron muestras de cuatro colores diferentes: mashua amarilla, amarilla que llora o “Yuracc wacca”, mashua roja, y mashua negra; tal como se muestra en la figura 5. Las semillas vegetativas de maca blanca, roja y negra, se obtuvieron del departamento de Junín, provincia de Junín y distrito de Carhuamayo (Figura 6). Las semillas botánicas de brócoli fueron adquiridas en el huerto hidropónico de la Universidad Nacional Agraria la Molina. Todas las semillas fueron sembradas en tierra vegetal y con riego permanente para mantener la capacidad de campo. Las hojas de los brotes que se utilizaron para la extracción del ADN fueron colectadas y colocadas en bolsas de polietileno; posteriormente fueron codificadas y guardaron a -20°C para su conservación.

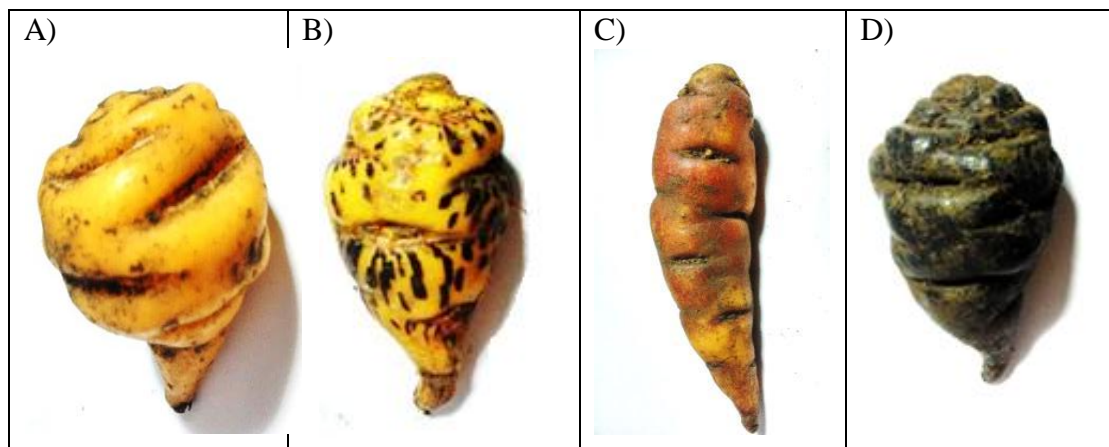


Figura 5. Muestras de tubérculos de mashua evaluadas en la tesis. De izquierda a derecha: fenotipos de mashua A) amarilla, B) “yuracc wacca”, C) roja y D) negra.

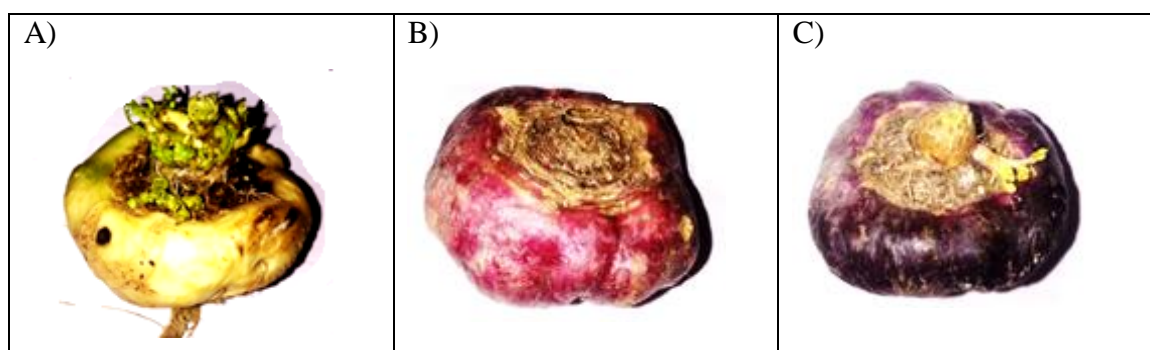


Figura 6. Muestras de hipocótilos de maca evaluadas en la tesis. De izquierda a derecha: fenotipos de maca A) blanca B) roja C) negra.

3.3. METODOLOGÍA: BIOINFORMÁTICA

3.3.1 Búsqueda de secuencias

Antes de realizar el diseño de los iniciadores, se buscaron secuencias que pertenecen a los genes principales reconocidos en la segunda etapa de biosíntesis de la ruta metabólica de glucosinolatos aromáticos: CYP79A2, CYP83A1, CYP83B1, SUR1, UGT74B1 y ST5a, para obtener cebadores específicos a nivel de dicho orden (Anexo 1, anexo 2, anexo 3, anexo 4, anexo 5 y anexo 6). Todas las secuencias se obtuvieron de las bases de datos: *GenBank* <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>>, y *Phytozome 12* <<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>>.

3.3.2 Alineamiento de secuencias nucleotídicas y de aminoácidos

Con los programas Clustal X y MAFFT se realizó el alineamiento múltiple de todas las secuencias nucleotídicas codificantes de cada gen encontrado en las bases de datos. A través de este procedimiento se pudo comparar y ubicar las secuencias consenso que deben ser de preferencia mayor a 18 nucleótidos (Pinzón, 2006).

Juntamente con el alineamiento nucleotídico, se realizó también el alineamiento aminoacídico. Para ello las secuencias nucleotídicas codificantes, se transformaron a formato CLUSTAL con el programa Clustal X. Este formato fue reconocido por el programa MEGA5, el cual alineó y permitió obtener las secuencias aminoacídicas a partir de sus secuencias nucleotídicas. Los aminoácidos obtenidos se compararon con las secuencias encontradas en la base de datos de *genbank*; y se ubicaron las zonas conservadas que deben ser mayor a 6 aminoácidos.

3.3.3 Diseño de iniciadores “simples” y degenerados

Para el diseño de los iniciadores simples se empleó el programa *Primer3plus* y la opción “detección”. Se insertó una secuencia a la cual se le marco las regiones conservadas para señalar las posibles zonas donde debería anclarse el juego de iniciadores diseñados. El juego de iniciadores obtenidos fue analizado individualmente y en pares, evaluando primero los parámetros obtenidos en el programa. Luego, cada iniciador mostrado se llevó al programa BLASTn para evaluar su especificidad. La complementariedad del iniciador se evaluó con el programa *OligoAnalyzer* 3.1 <<http://www.idtdna.com/calc/analyzer>>, donde el valor mínimo de la ΔG° debe ser de -9Kcal/mol, que es un valor recomendado por el mismo programa empleado. La temperatura de alineamiento con la que se debe de partir para estandarizar el iniciador se obtuvo restando 5°C menos a la Temperatura de fusión obtenida.

En el caso del diseño de los iniciadores degenerados, también se empleó el programa *primer3plus* y se tuvo las mismas consideraciones que para el diseño de iniciadores simples. La especificidad del iniciador con menos puntos degenerados se evaluó con el programa BLAST. Cabe mencionar que se tuvo en cuenta la transición o transversión del nucleótido en variación y la degeneración del aminoácido (Tabla 2). Se han

reportado trabajos de investigación donde se diseñaron iniciadores que tenían de 2 a 4 nucleótidos degenerados, que dependieron de la distancia filogenética de las secuencias alineadas con respecto a la secuencia a amplificar (Shen *et al.*, 1998; Brunel *et al.*, 1999). En el presente estudio, para el juego de iniciadores degenerados se consideró como máximo dos nucleótidos degenerados, por lo menos para un iniciador del juego, ya que a mayor variabilidad de estos, mayor inespecificidad del iniciador.

Tabla 2. Código genético.

	U	C	A	G
U	UUU Phe (F) UUC UUA Leu (L) UUG	UCU UCC Ser (S) UCA UCG	UAU Tyr (Y) UAC UAA Stop UAG Stop	UGU Cys (C) UGC UGA Stop UGG Trp (W)
C	CUU CUC Leu (L) CUA CUG	CCU CCC Pro (P) CCA CCG	CAU CAC His (H) CAA CAG Gln (Q)	CGU CGC Arg (R) CGA CGG
A	AUU AUC Ile (I) AUA AUG Met (M)	ACU ACC Thr (T) ACA ACG	AAU AAC Asn (N) AAA AAG Lys (K)	AGU AGC Ser (S) AGA AGG Arg (R)
G	GUU GUC Val (V) GUA GUG	GCU GCC Ala (A) GCA GCG	GAU GAC Asp (D) GAA GAG Glu (E)	GGU GGC Gly (G) GAA GGG

FUENTE: Watson et al, 2008.

3.4. EXTRACCIÓN DEL MATERIAL GENÉTICO

Para la extracción de ADN de las tres especies se utilizó el método de Doyle & Doyle (1987), el cual sufrió modificaciones en el presente trabajo.

El procedimiento se inició moliendo en un mortero aproximadamente 4g de tejido fresco con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino, de inmediato se llevó a tubos de *ependorff* de 2ml previamente enfriados y se agregó 700µl de *buffer* de extracción

CTAB 2X (Anexo 7) y 2µl de mercaptoetanol. Se homogenizó por inversión y se incubó a 65°C en baño maría durante 60 minutos agitando suavemente cada 15 minutos. Luego se enfrió a temperatura ambiente por 2-5 minutos, y se agregó 700µl de solución cloroformo – alcohol isoamílico 24:1 (Anexo 7). Cada tubo fue homogenizado suavemente para no dañar el ADN, hasta obtener un líquido lechoso. Se Centrifugó por 15 minutos a 14000 RPM y se transfirió el sobrenadante a tubo *eppendorf* de 1.5ml, teniendo cuidado de no absorber la interfase.

Al tubo que contenía el sobrenadante se le añadió 50µl de CTAB 10X (anexo 7) y se agitó suavemente hasta obtener una mezcla uniforme. Luego se agregó 700µl de solución cloroformo–alcohol isoamilico 24:1 y se mezcló suavemente. Las muestras fueron centrifugadas a 14000RPM durante 10-15 minutos y se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo de *eppendorf* de 1.5ml.

A cada muestra obtenida se le añadió un volumen igual de isopropanol frío (generalmente 400-500µl) o etanol absoluto frío y se mezcló suavemente hasta visualizar la medusa de ADN. Se incubó el ADN a una temperatura de -20°C por 30 minutos para luego centrifugarlo a 14000RPM por 15 minutos. Se retiró el sobrenadante cuidando de no perder el pellet de ADN y se dejó secar por 2 minutos.

Posteriormente se lavó el *pellet* agregando 1ml de etanol al 70 por ciento, se centrifugó por 10 minutos a 1400RPM y luego se eliminó el etanol cuidando de no perder el pellet. Para el segundo lavado se agregó en el pellet 1ml de etanol al 90 por ciento repitiendo el mismo proceso del primer lavado. Se dejó secar el pellet a temperatura ambiente por 12-14 horas, invertidos sobre papel filtro.

Una vez seco, se resuspendió el pellet en buffer TE (anexo 7); el volumen a utilizar dependió del tamaño del pellet (70–80 µl aproximadamente). Se incubó a 65°C por 10 minutos en el termoblot y luego se homogenizó el pellet con suaves movimiento tratando de disolverlo. Se agregó 2µl de RNAsa y se homogenizó lentamente, luego se llevó a incubación por 1 hora a 37°C. Finalizando este paso se guardaron las muestras a -20°C para su conservación.

- **Determinación de la Calidad de ADN**

La calidad del ADN obtenido se verificó por electroforesis en gel de agarosa al 1 por ciento (Anexo 8). Las muestras para cargar sobre el gel fueron preparadas con 3 µl de DNA, 6.99 µl del marcador a 1X y 0.1 µl de Gel-red (Biotium®) . Se colocó la mezcla en los pocillos de gel de agarosa y se encendió la fuente de poder a 100V por un tiempo aproximado de 1 hora. Finalmente se llevó al fotodocumentador de geles Biometra UVsolo TS, para visualizar las bandas de ADN.

Para determinar la concentración y pureza de ADN genómico extraído se hicieron lecturas de la absorbancia de las muestras de ADN en el espectrofotómetro para microplacas Epoch, considerándose la relación A_{260}/A_{280} como un estimado de pureza.

3.5 VALIDACIÓN DE LOS INICIADORES

3.5.1 Estandarización y prueba de reacción de la cadena de polimerasa (PCR)

Una vez obtenido los pares de iniciadores (sintetizados por GBToligos y Genlab) y el ADN genómico de cada una de las muestras en estudio y del control, se realizó la estandarización de la amplificación de los fragmentos de interés. Para ello, se establecieron concentraciones apropiadas del MgCl₂, dNTPs, iniciadores, ADN taq polimerasa *Thermo Fisher scientific*® y ADN molde, para obtener la mezcla de reacción. Además se estandarizó el perfil de temperatura, donde la temperatura de alineamiento y el número de ciclos sufrió variaciones por cada iniciador. Cabe resaltar que para los iniciadores simples se trabajaron con una sola temperatura de alineamiento (PCR convencional); sin embargo, los iniciadores degenerados se trabajaron con el PCR *touchdown*. En el PCR *touchdown* se empleó una temperatura de alineamiento inicial que fue disminuyendo según lo programado, hasta llegar a una temperatura más baja y obtener así todo un rango de posibilidades para que el iniciador amplifique la secuencia de interés.

Después de homogenizar la reacción y sellar los tubos, se colocaron en el termociclador Veriti 96 *well thermal cycler*, donde se programaron las condiciones de amplificación que fueron estandarizadas para cada juego de iniciador (Tabla 12, 13, 14, y 15). Finalmente se separaron los fragmentos por electroforesis (8 μ l de muestra más 1.9 μ l de Sal10X y 0.1 μ l de gel red) en un gel de agarosa al 1.5% en solución tampón TBE1X. Las bandas obtenidas fueron visualizadas con el fotodocumentador en presencia de luz UV.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1. BÚSQUEDA Y ALINEAMIENTO DE SECUENCIAS

Se hallaron secuencias de los genes de la ruta biosintética de glucosinolatos aromáticos pertenecientes al orden Brassicales, que corresponden a la familia Brassicaceae a excepción de *Tarenaya hassleriana*, que pertenece a la familia Cleomaceae (Anexo 1, Anexo 2, Anexo 3, Anexo 4, Anexo 5 y Anexo 6). También se hallaron secuencias hipotéticas en *Capsella rubella* y *Eutrema salsugineum* especies que pertenecen a la familia Brassicaceae.

La posición de las zonas conservadas y los iniciadores diseñados se realizarán en *B. oleracea* var. Capitata debido a que se encuentra filogenéticamente más relacionada con el control (*B. oleracea* var. Itálica), respecto a las otras secuencias obtenidas en este estudio. Además, en la base de datos *Phytozome* 12, se encontró el gen completo de *Brassica oleracea* var. Capitata y se pudo identificar la zona codificante de la zona no codificante para cada gen en estudio.

En el alineamiento nucleótido se localizaron zonas conservadas mayor o igual a 17pb, y las zonas conservadas aminoacídicas fueron de 6 a más aminoácidos, ya que es una proporción similar al tamaño mínimo recomendado, para el diseño de iniciadores simples (Yang *et al.*, 2006 y Pinzon, 2006).

CYP79A2

Las secuencias nucleotídicas de los genes CYP79A2 se alinearon para obtener zonas conservadas para el diseño de iniciadores “simples”, estas secuencias correspondieron a

las especies: *B. oleracea* var. *Capitata*, *Arabidopsis thaliana*, *Arabidopsis lyrata*, *Brassica rapa* subsp. *Pekinensis*, *Brassica napus*, *Brassica rapa* subsp. *Chinensis*, *Camelina sativa* y *T. hassleriana* (Figura 7). Todas estas especies son de la familia Brassicaceae, a excepción de *T. hassleriana* que pertenece a la familia Cleomaceae (Anexo 1). Al alinear estas ocho secuencias no se encontraron zonas conservadas mayores a 17 nucleótidos por lo que se decidió excluir la secuencia de *T. hassleriana* por ser la que generaba mayor variación en el alineamiento. Después de ello se observaron cuatro zonas conservadas de 17 a 24 nucleótidos que se ubicaron en el primer exón.

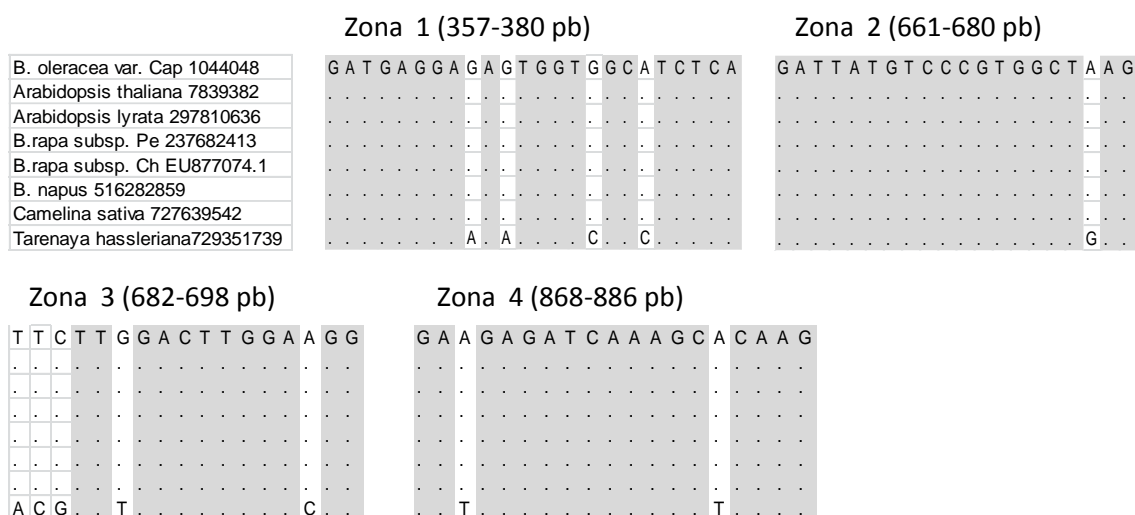


Figura 7. Alineamiento nucleotídico de las secuencias encontradas del gen CYP79A2. Entre paréntesis se encuentra la posición de la zona conservada en el gen de *B oleracea* var. *capitata*.

Para los iniciadores degenerados, además de las especies ya alineadas se agregaron las secuencias hipotéticas de *Capsella rubella* y *Eutrema salsugineum* (Figura 8). La base de datos del NCBI indica que estas secuencias posiblemente pertenecen a la familia del citocromo P450 pero no especifican el gen al cual pertenece. Sin embargo, se les ha considerado en este estudio por presentar una gran similitud con las secuencias empleadas en el alineamiento. Se trabajó con las zonas que tenían como mínimo seis aminoácidos conservados consecutivamente, y se encontró cinco zonas conservadas donde tres de ellas se encontraron en el primer exón, y dos en el segundo exón.

Las zonas conservadas se ubicaron en el primer exón debido a que las secuencias codificantes de *B. napus* y *B. rapa* subsp. Chinensis fueron secuencias cortas de 963 y 981pb respectivamente, que se alinearon con el primer exón de las demás secuencias empleadas (Anexo 1).

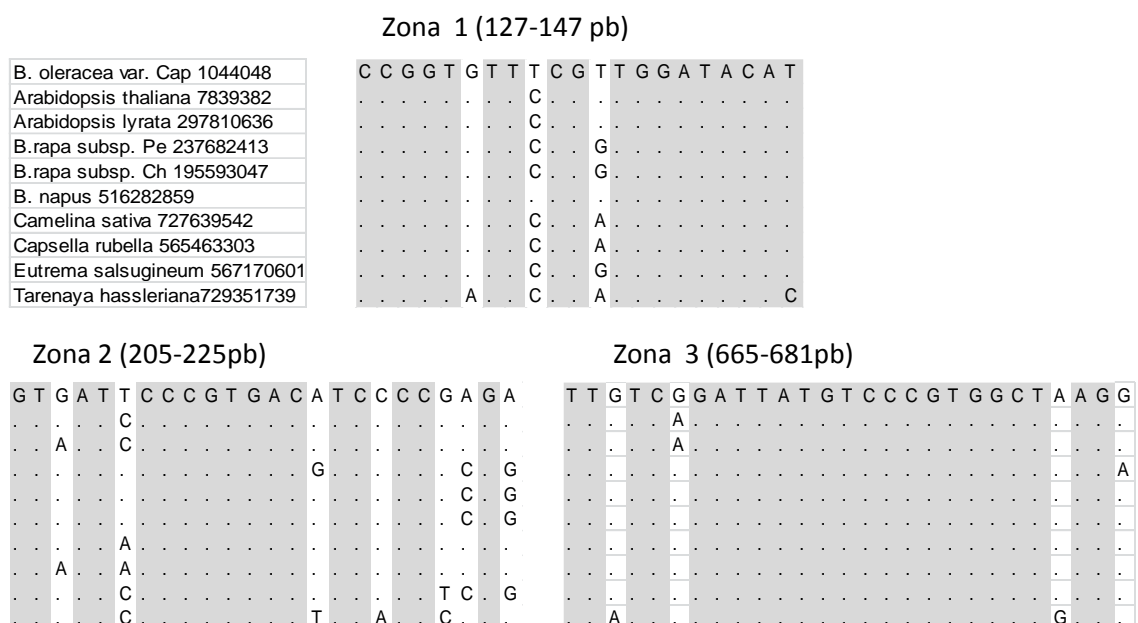


Figura 8. Secuencias nucleotídicas provenientes del alineamiento de aminoácidos del gen CYP79A2. Entre paréntesis se encuentra la posición de la zona conservada en el gen de *B. oleracea* var. capitata.

CYP83A1

Las secuencias nucleotídicas del gen CYP83A1 que pertenecen a las especies: *B. oleracea* var. Capitata, *A. thaliana*, *A. lyrata*, *B. rapa* subsp. Pekinensis, *B. rapa* subsp. Chinensis, *B. napus*, *B. nigra*, *B. juncea*, *Boechera stricta*, *Eruca vesicaria*, *Raphanus sativus* y *Camelina sativa* y *Telluginella halophila* (Anexo 2 y Figura 9); se alinearon para obtener zonas conservadas para el diseño de iniciadores “simples”. Al alinear todas estas secuencias no se hallaron zonas conservadas.

Para diseñar los iniciadores degenerados, se alinearon las secuencias antes mencionadas, además se incorporó secuencias hipotéticas como de *Eutrema*

Continuación...

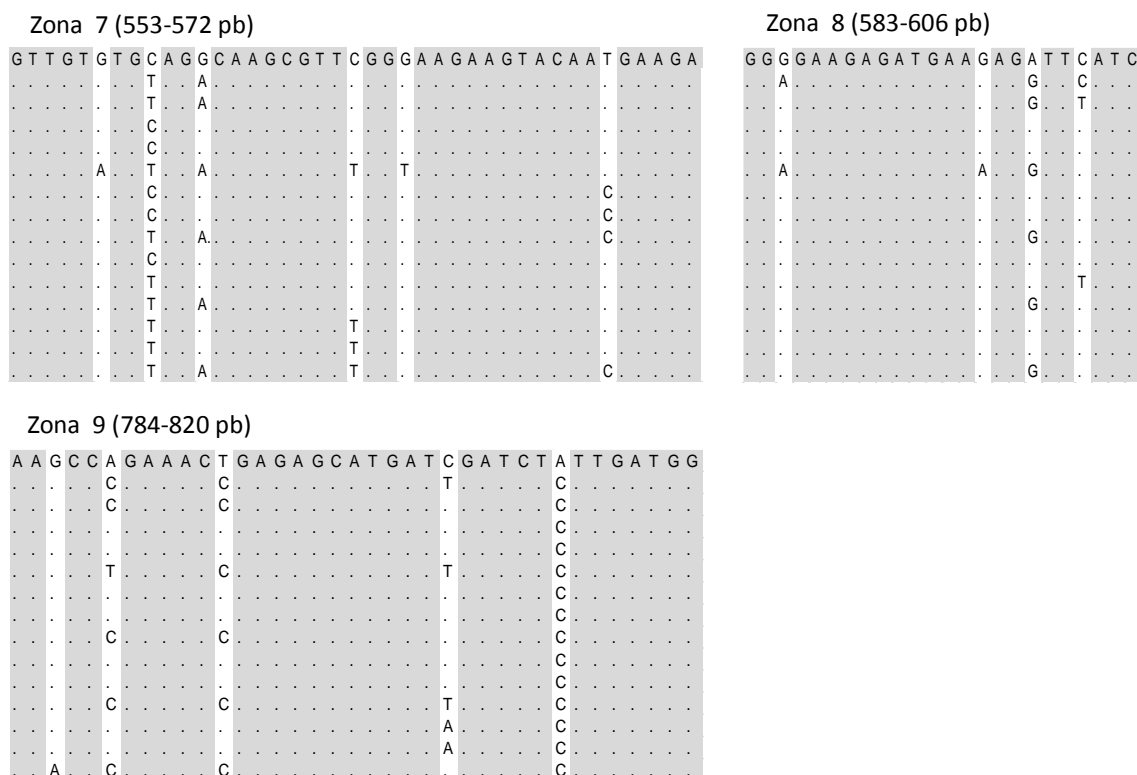


Figura 9. Secuencias nucleotídicas provenientes del alineamiento de aminoácidos del gen CYP83A1. Entre paréntesis se encuentra la posición de la zona conservada en el gen de *B. oleracea* var. capitata.

CYP83B1

Para obtener los iniciadores simples del gen CYP83B1, se alinearon secuencias de las especies: *B. oleracea* var. Capitata, *A. thaliana*, *A. lyrata*, *B. rapa* subsp. Pekinensis, *B. rapa* subsp. Chinensis, *B. rapa* subsp. rapa, *B. oleracea* var. botrytis, *B. oleracea* var. Itálica, *B. napus*, *B. oleracea* var. oleracea, *R. sativus* cultivar ShenFeng, *E. vesicaria*, *C. sativa*, *B. stricta* y *T. hassleriana* (Anexo 3). Al alinear las secuencias no se hallaron zonas conservadas, ya que *T. hassleriana* en la mayoría de los casos, presentaba diferencias con las demás secuencias, por lo que se optó excluirla en el alineamiento. Después de ello se observaron 5 zonas conservadas que se ubicaron en los dos exones presentes en el gen (Figura 10). A pesar que en la zona 1 y 4 se observaron variación con las secuencias pertenecientes a la familia Brassicaceae, se decidió poner emplear esas zonas para el diseño de iniciadores.

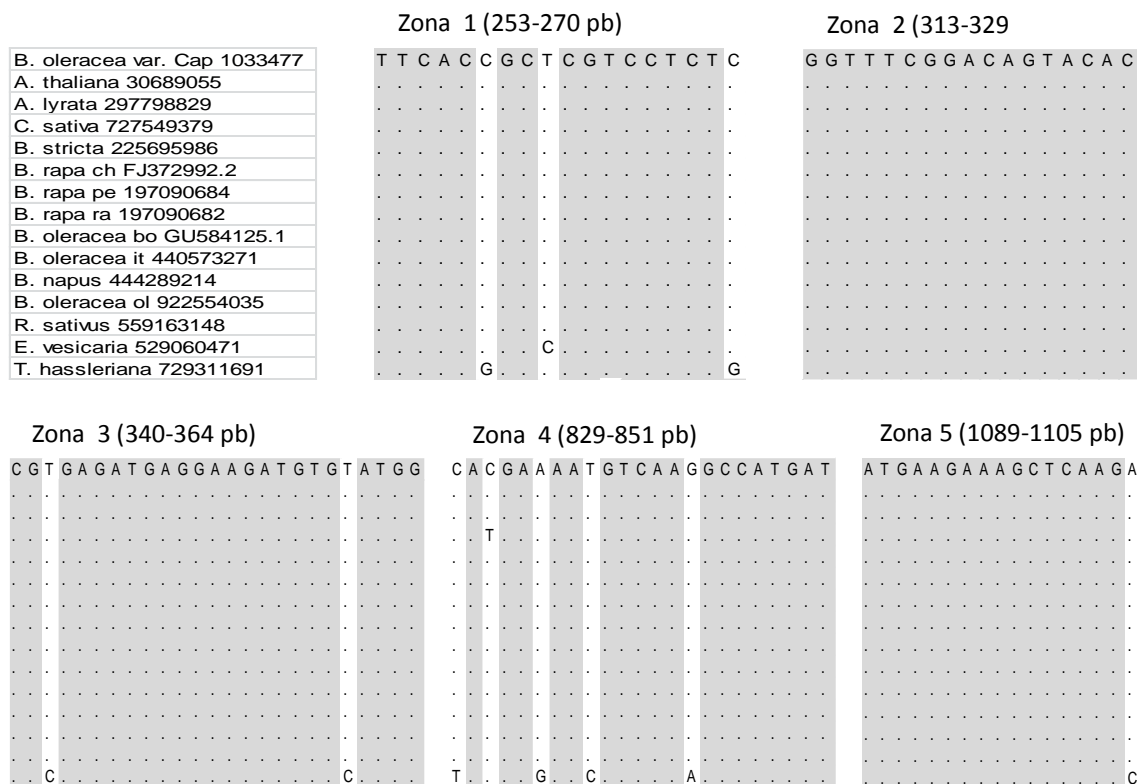


Figura 10. Alineamiento nucleotídico de las secuencias encontradas del gen CYP83B1. Entre paréntesis se encuentra la posición de la zona conservada en el gen de *B. oleracea* var. capitata.

Para los iniciadores degenerados, las secuencias nucleotídicas antes mencionadas se alinearon junto con las secuencias hipotéticas de *E. salsaugineum* y *C. rubella*, que en la base de datos de NCBI indica que se asemeja a enzimas del citocromo P450; además, son similares con las secuencias del gen en estudio. Se halló 18 zonas conservadas que se ubicaron en ambos exones (Figura 11).

continuación...

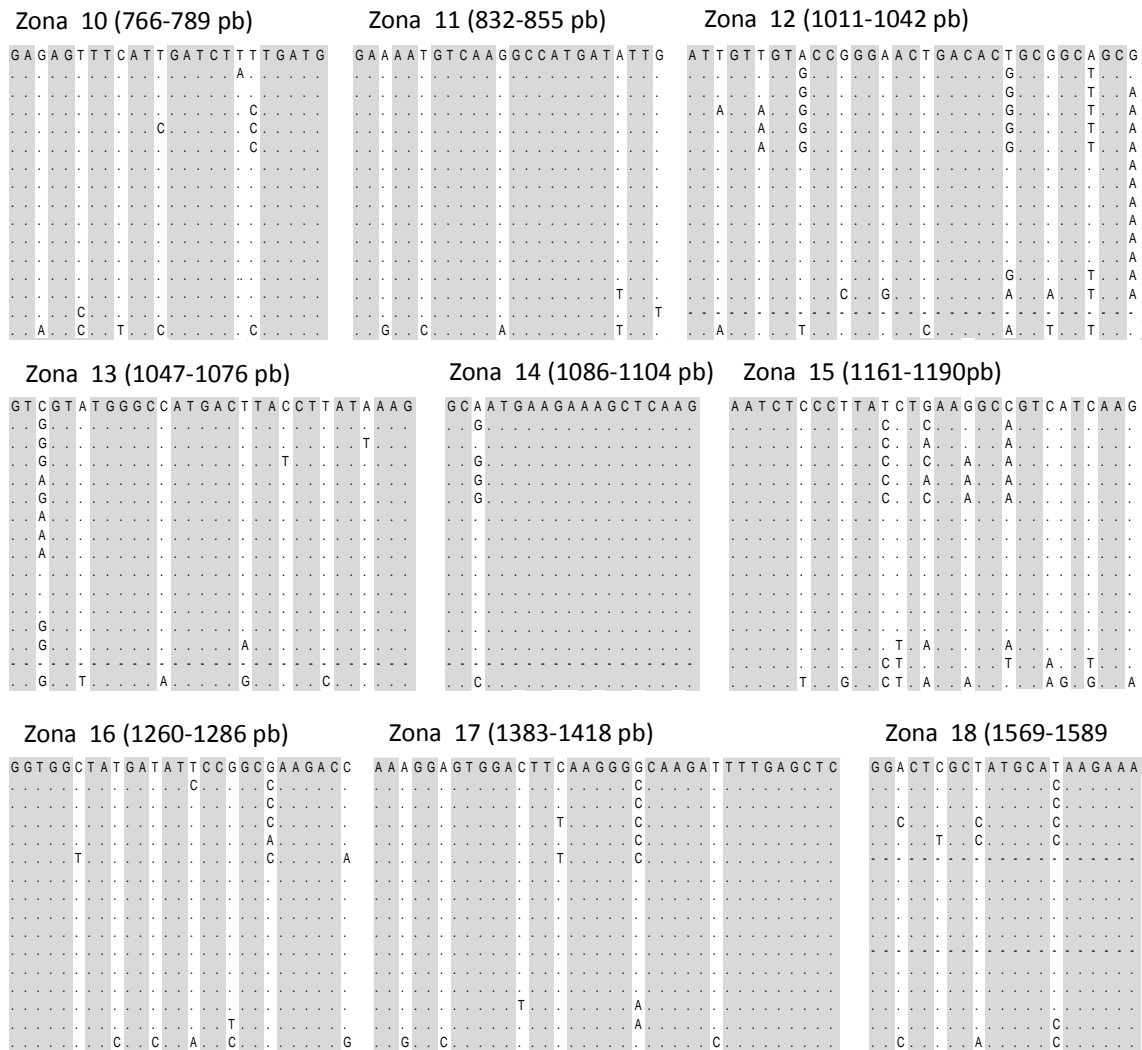


Figura 11. Alineamiento nucleotídico proveniente del alineamiento de aminoácidos del gen CYP83B1. Entre paréntesis se encuentra la posición de la zona conservada en el gen de *B. oleracea* var. capitata.

SUR1

Las secuencias nucleotídicas de los genes de SUR1 que se alinearon para posteriormente diseñar los iniciadores “simples” pertenecen a las especies de: *B. oleracea* var. Capitata, *A thaliana*, *A. lyrata*, *Camelina sativa*, *B. rapa* subsp. Pekinensis, *B. rapa* subsp. Pekinensis cultivar Matsuchima, *B. rapa* subsp. Rapa cultivar Tops Rapa 60 Giorni, *B. rapa* subsp. Rapa cultivar Tops Rapa Febbrario, *B. rapa* subsp. Rapa cultivar Tokyo top, *B. rapa* subsp. Rapa cultivar White lady, *B. rapa*

subsp. Rapa cultivar yorii spring, *B. rapa* subsp. Chinensis, *B. oleracea* var. oleracea y *E. vesicaria* (Anexo 4). Al alinear las secuencias se halló seis zonas conservadas en los distintos exones que presenta el gen (Figura 12).

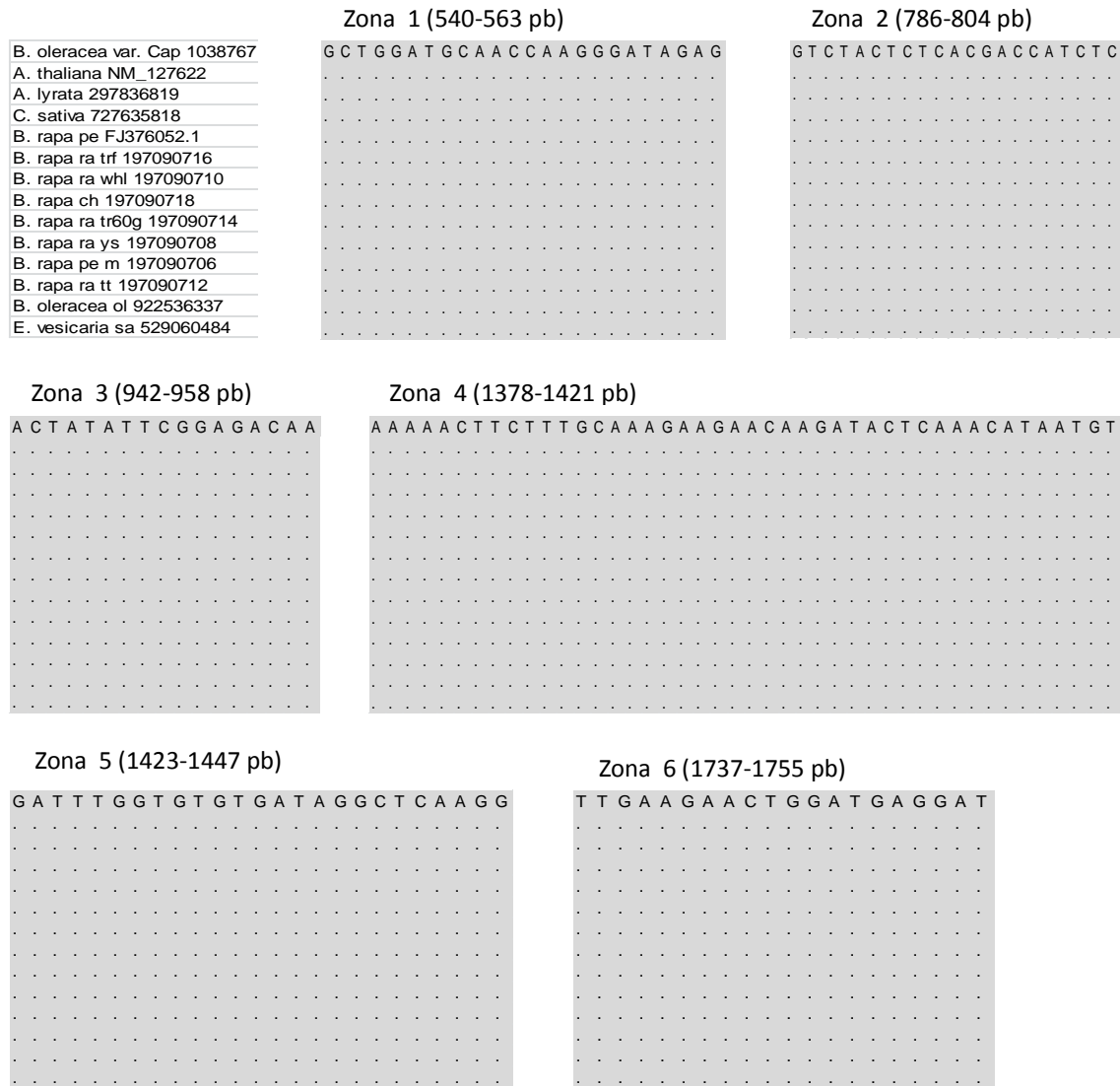
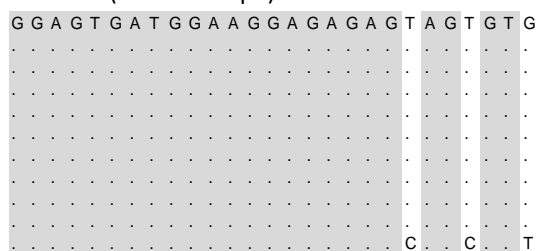


Figura 12. Alineamiento nucleotídico de las secuencias encontradas del gen SUR1. Entre paréntesis se encuentra la posición de la zona conservada en el gen de *B. oleracea* var. capitata.

Para los iniciadores degenerados, las secuencias antes mencionadas se alinearon junto con las secuencias hipotéticas de *E. salsugineum* y *C. rubella* que según la base de datos de NCBI se asemeja a la secuencia aminoacídica de SUR1. En este alineamiento no se encontraron zonas conservadas.

Continuación...

Zona 9 (1168-1194 pb)



^a La zona 1 no se encuentra alineada con *B. oleracea* var. *Capitata*, debido a que esa zona no se encuentra en la secuencia del gen.

Figura 14. Alineamiento nucleotídico proveniente del alineamiento de aminoácidos del gen UGT74B1. Entre paréntesis se encuentra la posición de la zona conservada en el gen de *B. oleracea* var. *capitata*.

ST5a

Las secuencias nucleotídicas de los genes de la enzima sulfotransferasa 5a (ST5a), conocida también como sulfotranferasa 16 (SOT16), se alinearon para obtener los iniciadores “simples” para lo cual se emplearon secuencias de las especies: *Brassica oleracea* var. *Capitata*, *A. thaliana*, *A. lyrata*, *C. sativa*, *T. hassleriana*, *B. rapa* subsp. *Pekinensis* cultivar *Matsuchima*, *B. rapa* subsp. *Rapa* cultivar *Tokyo top*, *B. rapa* subsp. *Rapa* cultivar *Tops Rapa* *Febbrario*, *B. rapa* subsp. *Rapa* cultivar *yorii spring*, *B. rapa* subsp. *Rapa* cultivar *White lady*, *B. rapa* subsp. *Rapa* cultivar *Kwan-Hoo Choi*, *B. rapa* subsp. *chinensis* y *B. oleracea* var. *Botrytis* (Anexo 6). En el alineamiento se observó solo una zona conservada, por ello se alineó sin contar a *T. Hassleriana* ya que presenta bastante diferencia por pertenecer a la familia *Cleomaceae*. En el alineamiento se obtuvo 5 zonas conservadas que van de 17 a 32 nucleótidos (Figura 15).

Para los iniciadores degenerados se incorporó secuencias hipotéticas como *E. salsugineum* y *C. rubella* que según la base de datos del NCBI se asemeja a una sulfotransferasa. Se encontró 9 zonas conservadas de 6 a 17 aminoácidos (Figura 16).

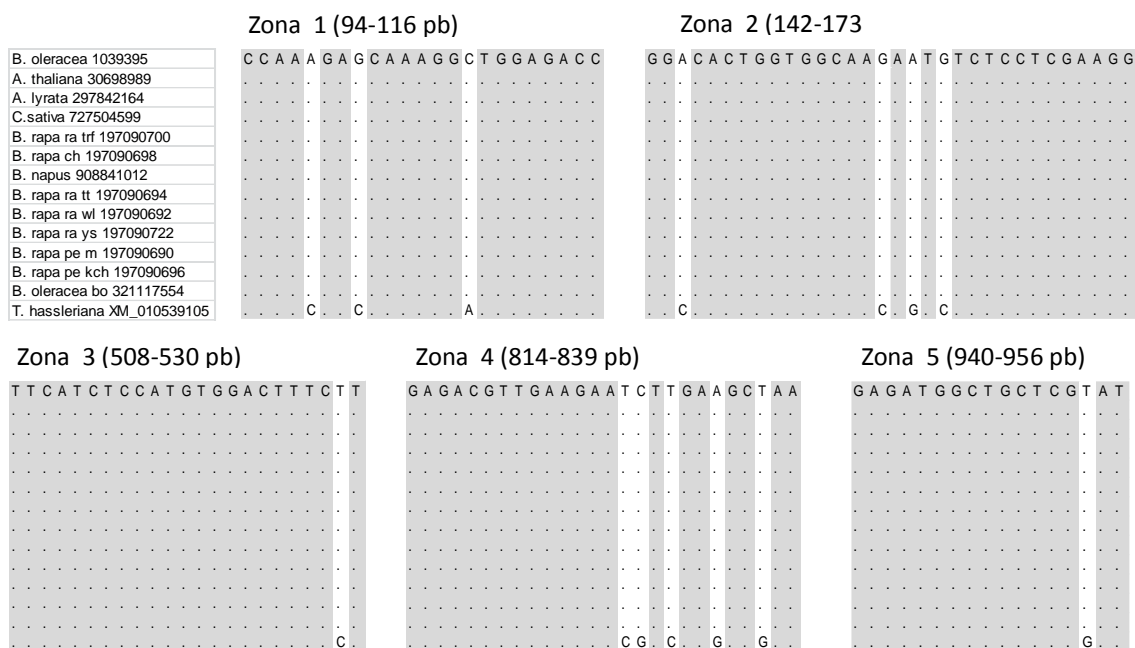
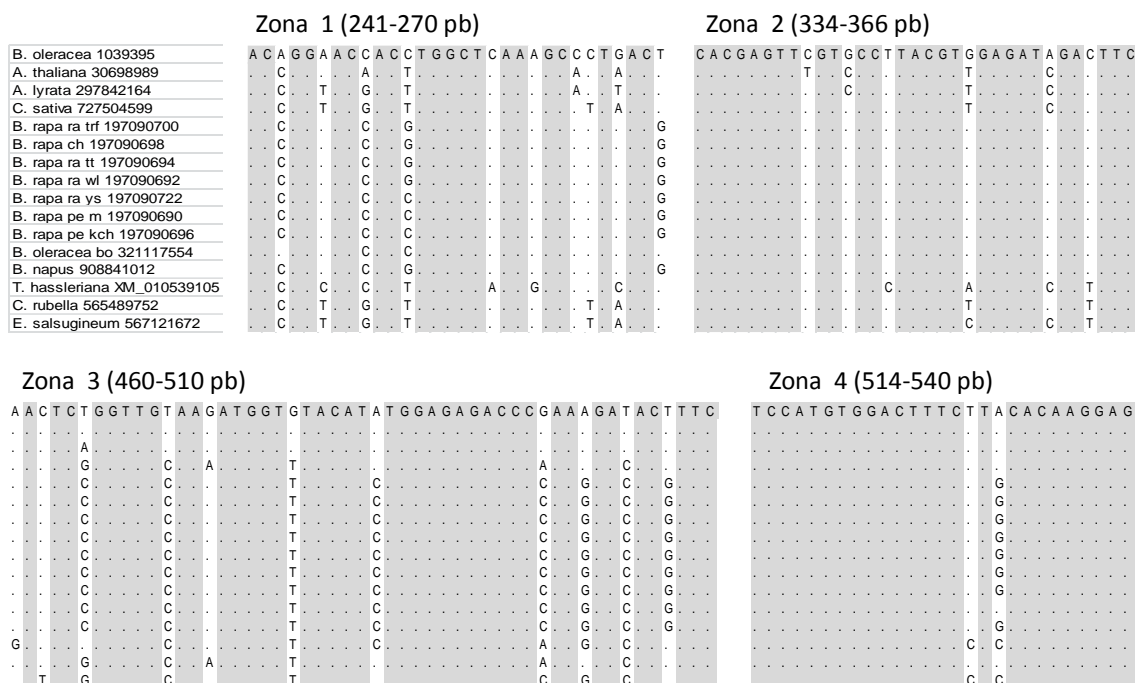


Figura 15. Alineamiento nucleotídico de las secuencias encontradas del gen ST5a. Entre paréntesis se encuentra la posición de la zona conservada en el gen de *B. oleracea* var. capitata.



Continuación...

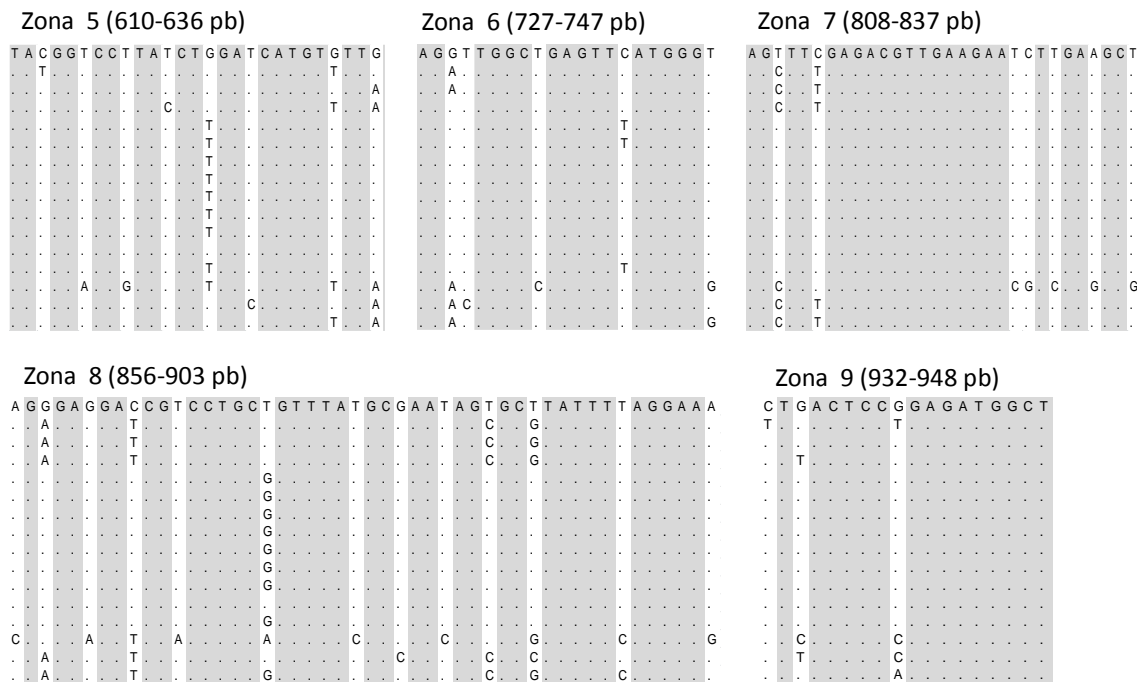


Figura 16. Alineamiento nucleotídico proveniente del alineamiento de aminoácidos del gen ST5a. Entre paréntesis se encuentra la posición de la zona conservada en el gen de *B. oleracea* var. capitata.

En el alineamiento de las secuencias codificantes completas de los genes CYP79A2, CYP83A1, CYP83B1, SUR1, UGT74B1 y ST5a; se observó diferencias entre las secuencias de la familia Brassicaceae y *T. hassleriana* de la familia Cleomaceae, lo que indica que la vía está bastante bien conservada en la familia Brassicaceae como lo indica Wang *et al.* (2013). Sin embargo, podría existir una diferencia considerable con otras familias, ya que a pesar de que *T. hassleriana* se es filogenéticamente cercana a la familia Brassicaceae, esta presenta diferencias con zonas conservadas obtenidas de las especies de la familia mencionada.

Debido a que en el alineamiento nucleotídico se observó una considerable variación con *T. hassleriana*, existe probabilidad de que los iniciadores simples diseñados posteriormente no amplifiquen en los genotipos de mashua, debido a que esta especie se encuentra en una familia mucho más alejada (Couvreur *et al.*, 2010).

4.2. DISEÑO DE INICIADORES

En la mayoría de los casos un iniciador se empleó para diferentes juegos de iniciadores previa evaluación. El amplicón obtenido con los iniciadores partió de la secuencia de *B. oleracea* var. Capitata.

Los iniciadores diseñados se evaluaron en base a los parámetros y recomendaciones dadas por los autores (Pinzon, 2006, Giorgio, s.f.). Algunos iniciadores no cumplieron en su totalidad por lo recomendado; sin embargo, se decidió poner a evaluación.

CYP79A2

Para este gen, se diseñó un único juego de iniciadores “simples” que se ubicó en el primer exón (Figura 17). Al realizar el alineamiento de los iniciadores con las secuencias de la base de datos del NCBI mediante el programa BLAST, este reconoció a las secuencias empleadas de la familia Brassicaceae. Los iniciadores simples cumplen por lo recomendado por los autores, excepto que el iniciador sentido presenta 17pb (Tabla 3) (Pinzon, 2006). A pesar del tamaño del iniciador, este demostró ser específico in silico.

Además, para el gen CYP79A2, se diseñaron iniciadores degenerados, que se ubicaron en el primer exon (Figura 18 y Tabla 4). De estos tres iniciadores degenerados diseñados, R1 presenta menor número de nucleótidos variables, el cual fue evaluado mediante alineamiento con la base de datos del NCBI utilizando BLAST, donde se observa que se alinea en su totalidad con las especies empleadas. A pesar que el iniciador L2 presentó una temperatura de fusión mayor a lo recomendado, y el juego de iniciadores CYP79A2.2d y el iniciador L2 presentaron un ΔG° menor a -9kcal/mol, se decidió poner a evaluación.

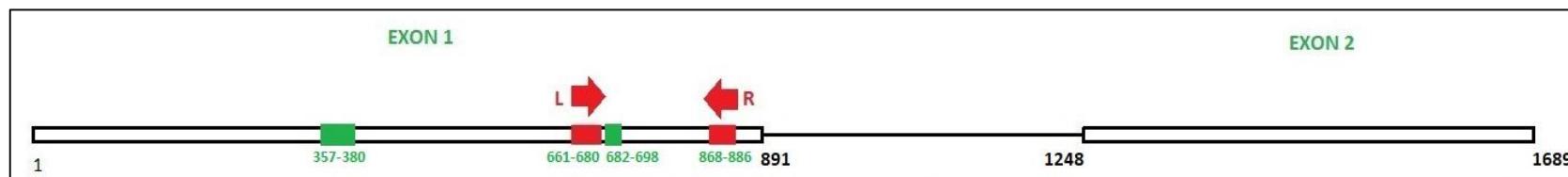


Figura 17: Posición de los iniciadores simples en el gen CYP79A2 de *B. oleracea* var. *Capitata*. Se observa la ubicación de las zonas conservadas de color verde, y de color rojo la posición donde se diseñaron los iniciadores.

Tabla 3: Información de los iniciadores simples del gen CYP79A2 obtenido en el programa *Primer3plus*. FUENTE: propia.

INICIADOR	POS.	PRIMERS (5´-3´)	NUM pb	Tm (°C)	GC%	AMPLICON	T° alineam.	ΔG° min del inic. ¹	ΔG° min del par ²
CYP79A2.1	L	TATGTCCCGTGGCTAAG	17	52,7	52,9	223	45.7°C	-3.61	-3.54
	R	CTTGTGCTTTGATCTCTTC	19	50,7	42,1			-4.62	

¹ ΔG° mínima obtenida de las horquillas y autodímeros formados por cada iniciador calculado por OligoAnalyzer 3.1

² ΔG° mínima obtenida de los heterodímeros formados por el juego de iniciadores calculado por OligoAnalyzer 3.1

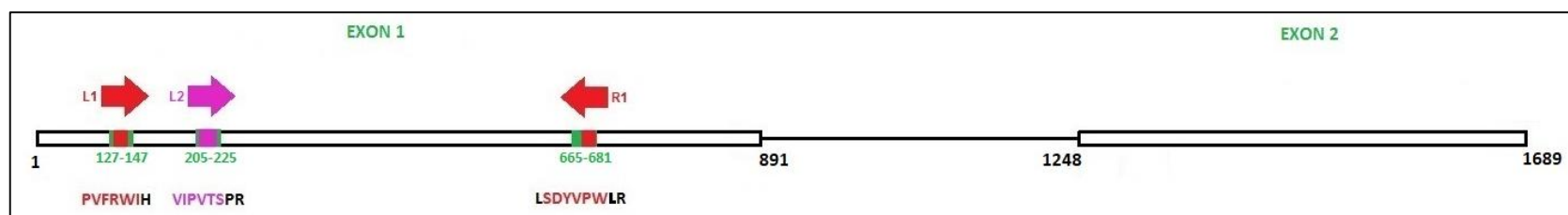


Figura 18. Posición de los iniciadores degenerados en el gen CYP79A2 de *B. oleracea* var. *Capitata*. Se observa la ubicación de las zonas conservadas de color verde; y de color rojo y fucsia la posición donde se diseñaron los iniciadores.

Tabla 4: Información de los iniciadores degenerados del gen CYP79A2 obtenido en el programa *primer3plus*.

INICIADOR	POS.	PRIMERS (5'-3')	NUM pb	T _m (°C)	GC%	AMPLICON	T° alineam.	ΔG° min del inic. ¹	ΔG° min del par ²
CYP79A2.1d	L1	CGGTRTTYCGNTGGATAC	18	61.9	52.2	550	56.9	-8.21	-8.10
	R1	AGCCACGGGACATAATCYGA	20	64.0	52.4			-6.68	
CYP79A2.2d	L2	GTRATHCCCGTGACNTCN	18	67.9	51.9	473	59.0	-13.15	-15.04
	R1	AGCCACGGGACATAATCYGA	20	64.0	52.4			-6.68	

¹ ΔG° mín. (Kcal/mol) obtenida de las horquillas y autodímeros formados del iniciador, calculado por OligoAnalyzer 3.1

² ΔG° mín. (Kcal/mol) obtenida de los heterodímeros formados para el juego de iniciadores, calculado por OligoAnalyzer 3.1

CYP83A1

Para este gen, no se obtuvo iniciadores simples en ninguna de las zonas conservadas. Se diseñó cinco iniciadores degenerados que se ubicaron en el primer exón, los cuales pueden amplificar hasta cuatro fragmentos del gen (Figura 19 y tabla 5). Del par de iniciadores, uno de ellos presenta menos puntos variables como el L1 y R2, que según el alineamiento de los iniciadores en el programa BLAST, reconocen a las secuencias pertenecientes al gen en estudio (Tabla 5). El iniciador R2 y el juego de iniciadores CYP83A1.1d, presentaron un ΔG° menor a -9Kcal/mol, lo que sugiere una posible formación de autodímeros y/u horquillas, o la formación de heterodímeros respectivamente; a pesar de ello se decidió poner a evaluación (Tabla 5).

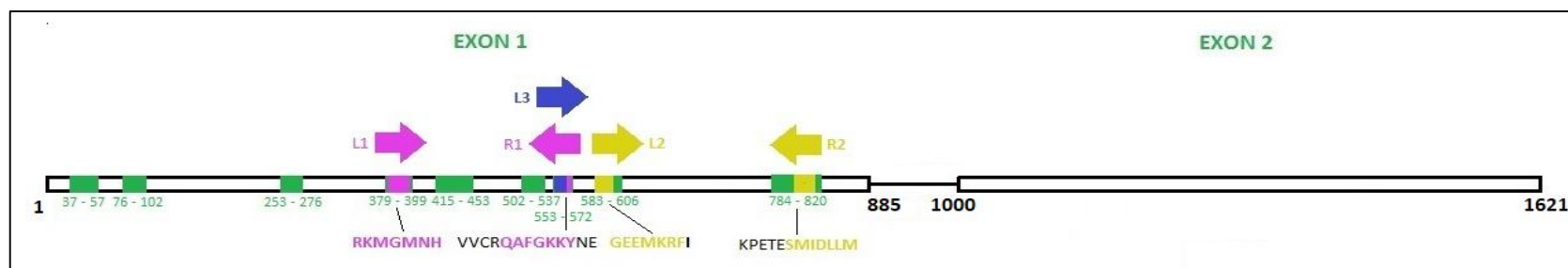


Figura 19: Posición de los iniciadores degenerados en el gen CYP83A1 de *B. oleracea* var. *Capitata*. Se observa la ubicación de las zonas conservadas de color verde; y de azul, mostaza y fucsia, la posición donde se diseñaron los iniciadores.

Tabla 5: Información de los iniciadores degenerados del gen CYP83A1 obtenido en el programa primer3plus.

INICIADOR	POS.	PRIMERS (5' - 3')	NUM pb	T _m (°C)	GC%	AMPLICON	T° alineam.	ΔG° min del inic. ¹	ΔG° min del par ²
CYP83A1.1d	L1	AGGAARATGGGGNATGAACCA	20	64,1	45.8	194	59,0	-5.35	-10.12
	R1	TACTTCTTNCRAACGCTTG	20	64.0	45.8			-4.54	
CYP83A1.2d	L2	GGRGAAGAGATGAARAGRTT	20	59.2	43.5	237	53,1	-1.94	-5.67
	R2	CATCAAGAGATCDATCATGC	20	58.1	40.9			-11.55	
CYP83A1.3d	L3	CAAGCGTTYGGNAAGAAGTA	20	61.8	45.8	267	53.1	-4.54	-4.54
	R2	CATCAAGAGATCDATCATGC	20	58.1	40.9			-11.55	
CYP83A1.4d	L1	AGGAARATGGGGNATGAACCA	20	64,1	45.8	441	53.1	-5.35	-8.89
	R2	CATCAAGAGATCDATCATGC	20	58.1	40.9			-11.55	

¹ ΔG° mín. (Kcal/mol) obtenida de las horquillas y autodímeros formados del iniciador, calculado por OligoAnalyzer 3.1

² ΔG° mín. (Kcal/mol) obtenida de los heterodímeros formados para el juego de iniciadores, calculado por OligoAnalyzer 3.1

CYP83B1

Se diseñaron cinco iniciadores “simples” que se ubicaron en el primer exón, los cuales pueden amplificar hasta cinco fragmentos del gen (Figura 20 y tabla 6). Los iniciadores fueron evaluados con el programa BLAST y reconocieron a las secuencias empleadas que pertenecen a la familia Brassicaceae, a excepción de L1 que no reconoció a la secuencia de *E. vesicaria*. Sin embargo, esta especie se encuentra filogenéticamente alejada de *L. meyenii*, por lo que se consideró que las diferencias entre ambas, no impedirían obtener amplificadas en maca (Couvreur et al., 2010). Los iniciadores R1 y R3 también presentaron un nucleótido de diferencia con *C. sativa* que filogenéticamente se encuentra relacionado con *L. meyenii*, pero se consideraron a pesar que esa diferencia pudiera influir en el amplificado de los genotipos de maca (Couvreur et al., 2010). Si consideramos que los dos últimos iniciadores mencionados no amplificarían en maca, entonces el juego de iniciadores más probable en amplificar sería CYP83B1.2, ya que el iniciador R2 si es específico para todas las secuencias alineadas de la familia Brassicaceae. Los iniciadores R3 y R1 presentaron un ΔG° , menor a lo esperado, por lo que los iniciadores podrían formar autodímeros u horquillas, pero a pesar de ello se decidió ponerlos a evaluación (Tabla 6).

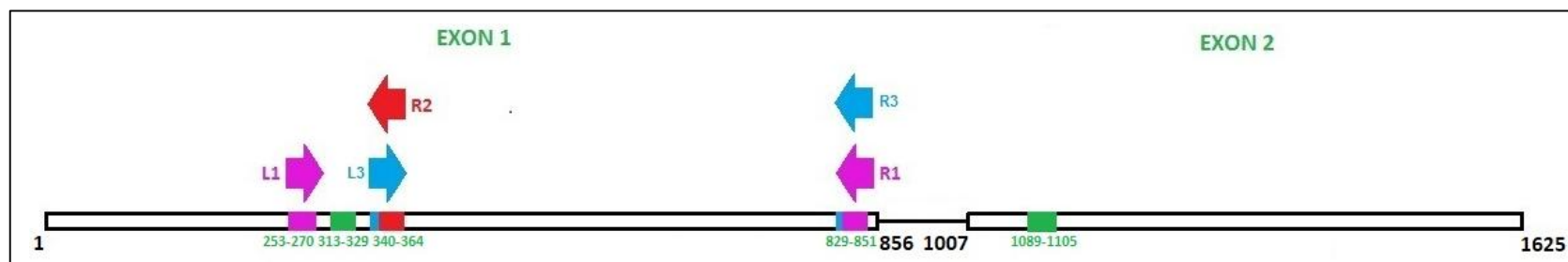


Figura 20: Posición de los iniciadores simples en el gen CYP83B1 de *B. oleracea* var. *Capitata*. Se observa la ubicación de las zonas conservadas de color verde; y de celeste, rojo y fucsia, la posición donde se diseñaron los iniciadores.

Tabla 6: Información de los iniciadores simples del gen CYP83B1 obtenido en el programa primer3plus.

INICIADOR	POS.	PRIMERS (5´-3´)	NUM pb	Tm (°C)	GC%	AMPLICON	T° alineam.	ΔG° min del inic. ¹	ΔG° min del par ²
CYP83B1.1	L1	TTCACCGCTCGTCCTCTC	18	60,1	61,1	597	55.1	-3.61	-3.61
	R1	CATGGCCTTGACATTTTCG	19	60,1	47,4			-9.28	
CYP83B1.2	L1	TTCACCGCTCGTCCTCTC	18	60,1	61,1	112	54.9	-3.61	-1.34
	R2	CCATACACATCTTCCTCATCTCAC	24	59,9	45,8			-1.47	
CYP83B1.3	L3	CGTGAGATGAGGAAGATGTGT	21	57,7	47,6	509	52.7	-3.61	-4.77
	R3	ATGGCCTTGACATTTTCGTG	20	60,9	45			-9.28	
CYP83B1.4	L1	TTCACCGCTCGTCCTCTC	18	60,1	61,1	596	55.1	-3.61	-3.61
	R3	ATGGCCTTGACATTTTCGTG	20	60,9	45			-9.28	
CYP83B1.5	L3	CGTGAGATGAGGAAGATGTGT	21	57,7	47,6	510	52.7	-3.61	-4.77
	R1	CATGGCCTTGACATTTTCG	19	60,1	47,4			-9.28	

¹ ΔG° mín. (Kcal/mol) obtenida de las horquillas y autodímeros formados del iniciador, calculado por OligoAnalyzer 3.1

² ΔG° mín. (Kcal/mol) obtenida de los heterodímeros formados para el juego de iniciadores, calculado por OligoAnalyzer 3.1

También se diseñaron iniciadores degenerados, que se ubicaron en el primer y segundo exon como se muestra en la figura 21. Se diseñaron ocho iniciadores, que amplificaron seis fragmentos en total. De cada par de iniciadores, uno de ellos presentó menos puntos variables como el L1, L2, L3 y R3 que según el BLAST reconoce a todas las secuencias empleadas en el alineamiento del gen (Tabla 7). El iniciador R2 presentó un ΔG° menor a lo recomendado, sin embargo, se decidió poner a evaluación (Tabla 7).

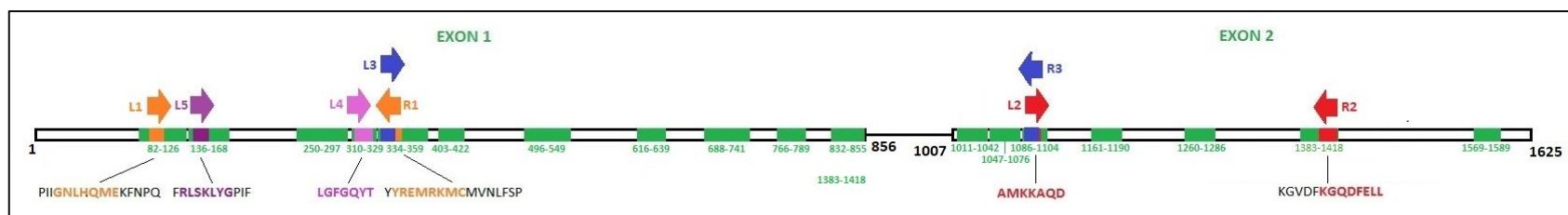


Figura 21. Posición de los iniciadores degenerados en el gen CYP83B1 de *B. oleracea* var. *Capitata*. Se observa la ubicación de las zonas conservadas de color verde, y de color azul, rojo, fucsia, morado y anaranjado, la posición de los iniciadores diseñados.

Tabla 7: Información de los iniciadores degenerados del gen CYP83B1 obtenido en el programa *primer3plus*.

INICIADOR	POS.	PRIMERS (5'-3')	NUM pb	T _m (°C)	GC%	AMPLICION	T° alineam.	ΔG° min del inic. ¹	ΔG° min del par ²
CYP83B1.1d	L1	GGAAACCTYCACCAGATGGA	20	61.7	55.0	269	56.0	-6.6	-6.6
	R1	CACATCTTCCTCATCTCRCG	20	61.0	52.4			-8.63	
CYP83B1.2d	L2	GCVATGAAGAAAGCTCAAG	19	60.3	47.6	333	54.7	-6.34	-7.91
	R2	GAGCTCAAARTCTTNGCCCTT	21	59,7	45,5			-9.49	
CYP83B1.3d	L3	CGYGAGATGAGGAAGATG	18	56.8	52.6	765	51.8	-8.63	-6.69
	R3	CTTGAGCTTTCTTCATBGC	19	59.2	47.6			-6.34	
CYP83B1.4d	L1	GGAAACCTYCACCAGATGGA	20	61.7	55.0	1014	54.2	-6.6	-5.46
	R3	CTTGAGCTTTCTTCATBGC	19	59.2	47.6			-6.34	
CYP83B1.5d	L4	CTBGGTTTCGGACAGTACAC	20	63.0	54.5	795	54.2	-3.65	-3.61
	R3	CTTGAGCTTTCTTCATBGC	19	59.2	47.6			-6.34	
CYP83B1.6d	L5	CGTCTCTCVAAGCTHTACGG	20	64.2	54.2	966	54.2	-13.27	-11.6
	R3	CTTGAGCTTTCTTCATBGC	19	59.2	47.6			-6.34	

¹ ΔG° mín. (Kcal/mol) obtenida de las horquillas y autodímeros formados del iniciador, calculado por OligoAnalyzer 3.1

² ΔG° mín. (Kcal/mol) obtenida de los heterodímeros formados para el juego de iniciadores, calculado por OligoAnalyzer 3.1

SUR1

Se diseñaron dos iniciadores “simples” que se encontraron en el segundo y quinto exón (Figura 22). Los iniciadores alineados con la secuencias de la base de datos del NCBI por medio del programa BLAST, reconoció a todas las secuencias que se emplearon para el diseño del iniciador; además todos cumplieron con lo remendado por los autores (Pinzón, 2006).

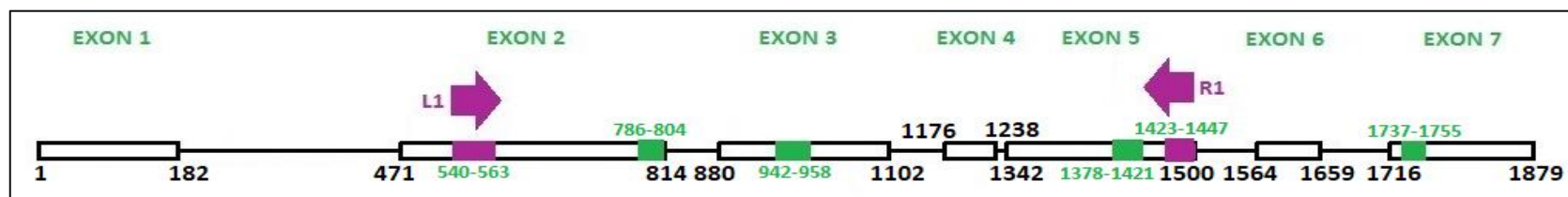


Figura 22: Posición de los iniciadores simples en el gen SUR1 de *B. oleracea* var. *Capitata*. Se observa la ubicación de las zonas conservadas mostradas de color verde; y de color morado, la posición donde se diseñaron los iniciadores.

Tabla 8: Información de los iniciadores simples del gen SUR1 obtenido en el programa *primer3plus*.

INICIADOR	POS.	PRIMERS (5'-3')	NUM pb	T _m (°C)	GC%	AMPLICON	T° alineam.	ΔG° min del inic. ¹	ΔG° min del par ²
SUR1.1	L1	GGATGCAACCAAGGGATAGA	20	59,9	50	901	52.1	-7.05	-5.61
	R1	GAGCCTATCACACACCAAATC	21	57,1	47,6			-3.14	

¹ ΔG° mín. (Kcal/mol) obtenida de las horquillas y autodímeros formados del iniciador, calculado por OligoAnalyzer 3.1

² ΔG° mín. (Kcal/mol) obtenida de los heterodímeros formados para el juego de iniciadores, calculado por OligoAnalyzer 3.1

UGT74B1

Para este gen se diseñó un juego de iniciadores “simples”, que se ubicaron en el segundo exón (Figura 23). Los iniciadores presentaron tres a cinco nucleótidos diferentes con la secuencia de *T. hassleriana*. Se evaluó la especificidad por medio del programa BLAST, y los iniciadores se alinearon en su totalidad con las secuencias de la familia Brassicaceae que se emplearon en el alineamiento, a excepción de *C. sativa*, a pesar que la secuencia se encuentra filogenéticamente relacionada con *L. meyenii* se decidió poner a evaluación (Couvreur et al., 2010).

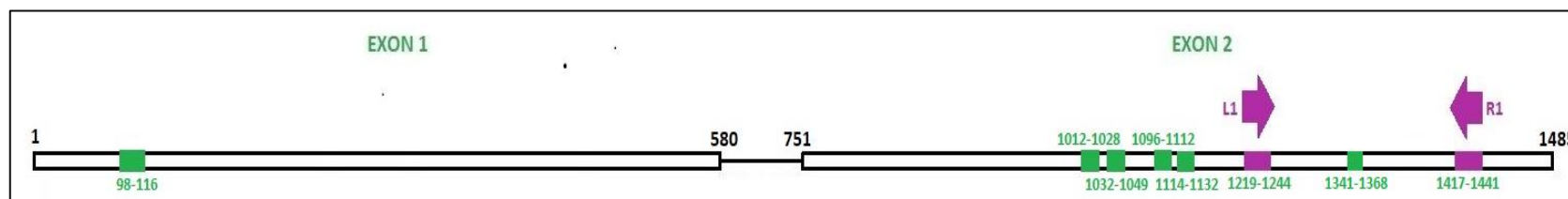


Figura 23: Posición de los iniciadores simples en el gen UGT74B1 de *B. oleracea* var. Capitata. Se observa la ubicación de las zonas conservadas mostradas de color verde; y de color fucsia, la posición donde se diseñaron los iniciadores.

Tabla 9: Información de los iniciadores simples del gen UGT74B1, obtenido en el programa primer3plus.

INICIADOR	POS.	PRIMERS (5'-3')	NUM pb	Tm (°C)	GC%	AMPLICON	T° alineam.	ΔG° min del inic. ¹	ΔG° min del par ²
UGT74B1.1	L	CAGTGGAGTGATCAGATGAATG	22	58,2	45,5	224	53.2	-8.53	-6.58
	R	CGATCAGAGCTTCCTCCTTC	20	59,1	55			-6.34	

¹ ΔG° mín. (Kcal/mol) obtenida de las horquillas y autodímeros formados del iniciador, calculado por OligoAnalyzer 3.1

² ΔG° mín. (Kcal/mol) obtenida de los heterodímeros formados para el juego de iniciadores, calculado por OligoAnalyzer 3.1

También se diseñaron tres iniciadores degenerados, los cuales amplificaron hasta 2 fragmentos del gen y se ubicaron en ambos exones del gen (Figura 24). Si se realiza un alineamiento de las secuencias de *B. oleracea* var. capitata y *B. oleracea* var. Itálica, se observa que los noventa primeros nucleótidos que presenta *B. oleracea* var. Itálica no se encuentran en *B. oleracea* var. Capitata. Por tanto el iniciador L2, que se encuentra entre la posición 64–83pb no se pudo alinear con la *B. oleracea* var. Capitata; sin embargo se trabajó con este iniciador ya que es específico para el gen en estudio y junto con el iniciador R1 abarcan casi la totalidad del gen.

Los iniciadores el R1 y L2 presentan menos nucleótidos variables, y al ser alineado en el programa BLAST, con las secuencias presentes en la base de datos del NCBI, reconocieron a las secuencias pertenecientes al gen en estudio. Los iniciadores L1 y L2 presentaron ΔG° menor a lo recomendado, lo que indica que podrían formar autodímeros u horquillas, sin embargo, se decidió poner a evaluación (Tabla 10).

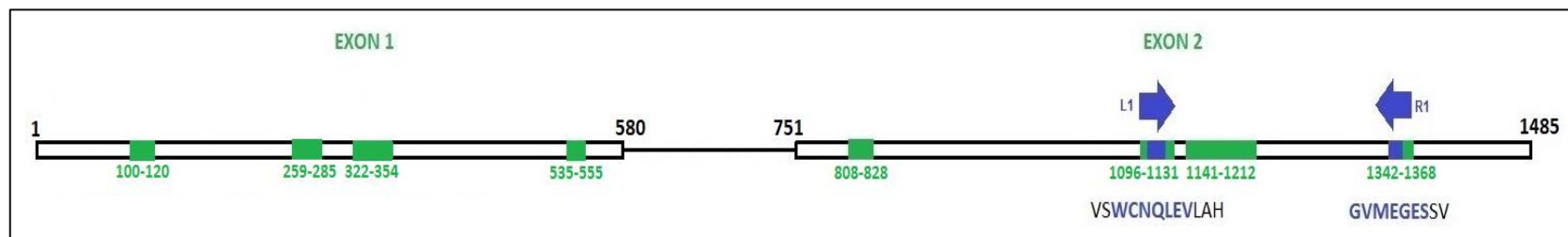


Figura 24. Posición de los iniciadores degenerados de UGT74B1 en el gen completo de *B. oleracea* var. capitata. Se observa la ubicación de las zonas conservadas mostradas de color verde; y de color azul, la posición donde se diseñaron los iniciadores.

Tabla 10: Información de los iniciadores degenerados del gen UGT74B1 obtenido en el programa *primer3plus*.

INICIADOR	POS.	PRIMERS (5'-3')	NUM pb	T _m (°C)	GC%	AMPLICON	T° alineam.	ΔG° min del inic. ¹	ΔG° min del par ²
UGT74B1.1d	L1	GGTGYAACCARCTDGAGGTT	20	63.0	50,0	260	56,3	-14.46	-5.40
	R1	RCTCTCTCCTCCATCACTCC	21	61.3	54.5			-2.24	
UGT74B1.2d	L2	TACCCAGTYCAAGGCCAYCT	20	64.3	54.5	1367 ³	56.3	-9.28	-6.61
	R1	RCTCTCTCCTCCATCACTCC	21	61.3	54.5			-2.24	

¹ ΔG° mín. (Kcal/mol) obtenida de las horquillas y autodímeros formados del iniciador, calculado por OligoAnalyzer 3.1

² ΔG° mín. (Kcal/mol) obtenida de los heterodímeros formados para el juego de iniciadores, calculado por OligoAnalyzer 3.1

³ El tamaño del amplicon se halló de la suma de la secuencia de la zona codificante obtenida por el juego de iniciadores en *B. oleracea* var *itálica* (1195pb) más el intrón de *B. oleracea* var. *Cap.* (172pb).

ST5a

En las zonas conservadas del alineamiento nucleotídico, el programa Primer3 plus no reconoció posibles iniciadores. En las zonas conservadas obtenidas a partir del alineamiento de aminoácidos, se observa que existe variación en las secuencia nucleotídicas, por lo que los iniciadores diseñados en esas zonas presentaron más de 2 nucleótidos degenerados en ambos iniciadores del juego (Figura 16). Esta variación lo hacía inespecífico, por lo que fueron descartados.

4.3. VALIDACIÓN DE INICIADORES

4.3.1. Extracción de ADN

La extracción de ADN de las muestras de maca, mashua y brócoli produjeron ADN con elevada integridad, calidad y concentración (Figura 25 y Tabla 11). La integridad fue determinada a través de electroforesis en geles de agarosa; no se observó un “barrido” considerable en ninguna de las muestras, por lo que se dedujo que todas las muestras de ADN presentaban elevada integridad (Figura 25).

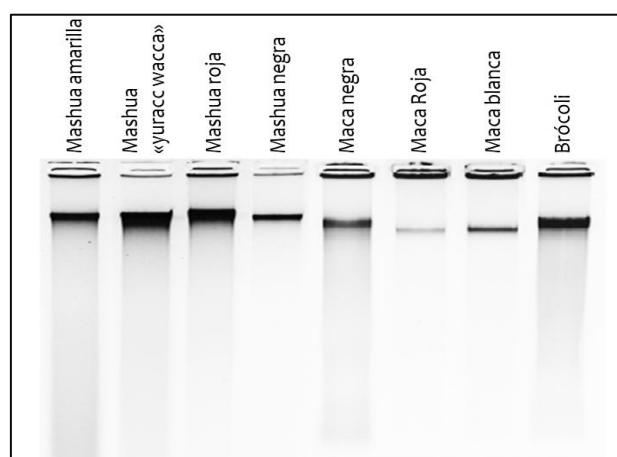


Figura 25. Calidad en gel de agarosa del ADN obtenido en muestras de mashua, maca y brócoli.

Tabla 11: Concentración y pureza del ADN extraído de las muestras utilizadas.

MATERIAL GENETICO	CONCENTRACION DE ADN (ng/ul)¹	PUREZA 260/280
Mashua negra	1237.24	1.812
Mashua “yuracc wacca”	455.47	1.648
Mashua roja	1186.90	1.889
Mashua amarilla	2621.64	1.949
Brócoli	3137.72	1.858
Maca blanca	2769.34	1.950
Maca roja	3237.54	1.865
Maca negra	3681.93	1.864

Así mismo, la calidad y concentración del ADN se determinó mediante espectrofotometría (Tabla 11). La calidad de las muestras, a través de la relación de las absorbancias 260 y 280, nos indica el grado de contaminación proteica, y para que la muestra sea aceptable debe encontrarse dentro del rango de 1.8-2.0

Se obtuvo una alta concentración de ADN en las diferentes muestras y el índice de pureza obtenido se encontró dentro de lo recomendado, a excepción de la Mashua “yuracc wacca” que obtuvo un índice de 1.648, que nos indica que posiblemente la concentración de contaminantes es mayor a la muestra de ADN presente (Tabla 11). Cadavid et al. (2013), amplificó con éxito un marcador en muestras de ADN que inicialmente tenían un índice de pureza $A_{260}/A_{280} < 1.5$, debido a la alta concentración de ADN obtenida, realizó diluciones de lo extraído hasta una proporción de 1:100 reduciendo de esta manera los posibles inhibidores de la PCR. La concentración de ADN obtenida en la mashua “yuracc wacca” permitió que la muestra pueda ser diluida hasta 1:20, para obtener una concentración final 20ng/ul, que fue un valor que se pretendió hallar en todas las muestras en estudio.

4.3.2. Amplificación de fragmentos de ADN

Debido que es la primera vez que se utilizan en la PCR estos iniciadores diseñados, se tuvieron que estandarizar parámetros de la mezcla de reacción y del perfil de temperatura para la amplificación. La mezcla de reacción fue una modificación a partir de los parámetros recomendados en la guía de usuario de la ADN taq polimerasa *ThermoFisher scientific* que se empleó en esta investigación.

En el master mix empleado para la amplificación de ambos tipos de iniciadores, los parámetros que sufrieron variación fueron: dNTPs, los iniciadores sentido y antisentido y la ADN taq polimerasa. El perfil de temperatura fue similar para ambos tipos de iniciadores (simples y degenerados), a excepción de la temperatura de alineamiento, número de ciclos y tiempo de Denaturación, hibridación y extensión, que fue estandarizada para cada uno de los juegos de iniciadores. Para la temperatura de alineamiento se tomó como base los datos obtenidos in sílico.

4.3.2.1. Amplificación de fragmentos con los iniciadores simples

En el caso de los iniciadores simples se empleó la misma mezcla de reacción para todos los juegos diseñados, pero las temperaturas de alineamiento y número de ciclos empleados en el PCR variaron por cada juego en estudio (Tabla 12 y 13).

Tabla 12: Mezcla de reacción para la amplificación de iniciadores simples por PCR (Master mix).

Reactivo	Concentración inicial	Cantidad por reacción (µl)
Agua libre de nucleasas (NFW)		4.55
PCR buffer	10X	1
MgCl	50mM	0.6
dNTPs	5mM	0.6
Iniciador sentido	10uM	0.5
Iniciador antisentido	10uM	0.5
ADN Taq polimerasa	5 U/µl	0.25
ADN molde	20ng/ul	2
Volumen final		10 ul

Tabla 13: Programa de PCR para los iniciadores “simples”.

Etapas de amplificación	Temperaturas	tiempo	Ciclos
Denaturación inicial	95°C	5´	1
Denaturación	95°C	1´	
Hibridación	TA*	1´	35/45 ^a veces
Extensión	72°C	1´	
Extensión final	72°C	7´	1

*Temperatura de alineamiento (TA): CYP79A2.1, TA: 60°C; CYP83B1.2, CYP83B1.4, TA: 55°C; CYP83B1.3, CYP83B1.5, UGT74B1 TA: 53°C; CYP83B1.1 TA: 58°C; SUR1 TA: 52°C;

^a Se programó 45 ciclo para los siguientes pares de iniciadores: CYP83B1.3, CYP83B1.5, SUR1.1 y UGT74B1.1

CYP79A2

Para este gen, la temperatura de alineamiento estandarizada fue de 60°C. Se encontraron bandas definidas en el control y en las muestras de maca, pero no se observó amplificados en ninguna de las muestras de mashua (Figura 26).

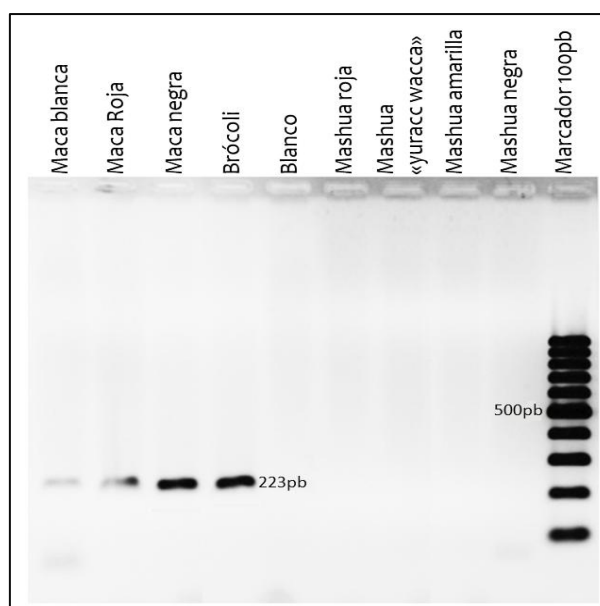


Figura 26. Amplificación del iniciador CYP79A2.1 en las muestras en estudio.

Los iniciadores simples mostraron especificidad con los diferentes genotipos de maca, y era de esperarse, ya que la zona escogida mostró homología con todas las secuencias de la familia Brassicaceae. La secuencia de *T. hassleriana* presentó diferencias de uno y dos nucleótidos con los iniciadores L y R respectivamente, la variación en esas zonas pudo haber sido mayor en mashua, por ende no se obtuvo amplificados.

En estudios realizados por Irmisch *et al.* (2013) se observa que los genes CYP79D6 y CYP79D7 que se encuentran en el álamo negro de la familia Salicaceae, puede transformar la fenilalanina en Z – fenilacetaldoxima; y a diferencia del CYP79A2, estas enzimas aceptaron varios aminoácidos como sustrato. No se debe descartar la posibilidad de que otro u otros genes podrían participar en la ruta de glucosinolatos aromáticos realizando la función de CYP79A2, para otras especies que no pertenezcan a la familia Brassicaceae.

CYP83B1

La temperatura de alineamiento estandarizada para los iniciadores CYP83B1.1 y CYP83B1.2 fue de 58°C, con la que se observó en el gel de agarosa la presencia de una banda intensa en el control positivo (brócoli), de un tamaño aproximado al esperado, que es de 597pb y 112pb respectivamente. Sin embargo, no se observó amplificados en las muestras de mashua y maca (Figura 27 y 28).

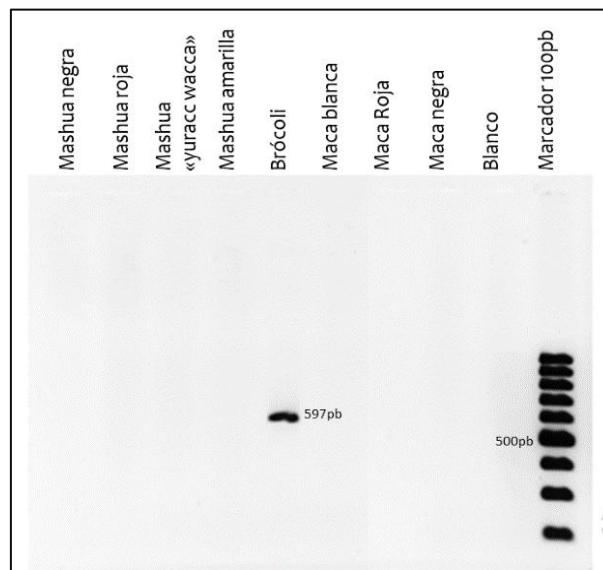


Figura 27. Amplificación del iniciador CYP83B1.1 en las muestras en estudio.

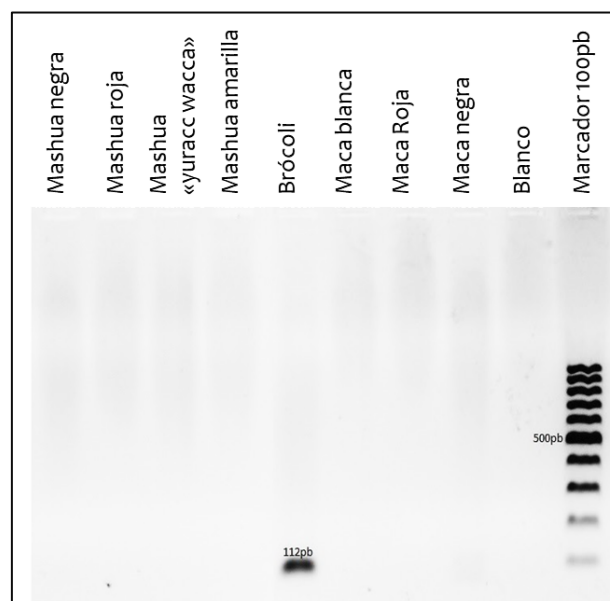


Figura 28. Amplificación del iniciador CYP83B1.2 en las muestras en estudio.

El juego de iniciadores CYP83B1.3, amplificó una banda específica en el control y en las muestras de maca a una temperatura de alineamiento de 53°C. Las bandas obtenidas en los diferentes genotipos de maca coinciden con el tamaño esperado que es de 509pb. No se observó ninguna banda amplificada en las muestras de mashua (Figura 29).

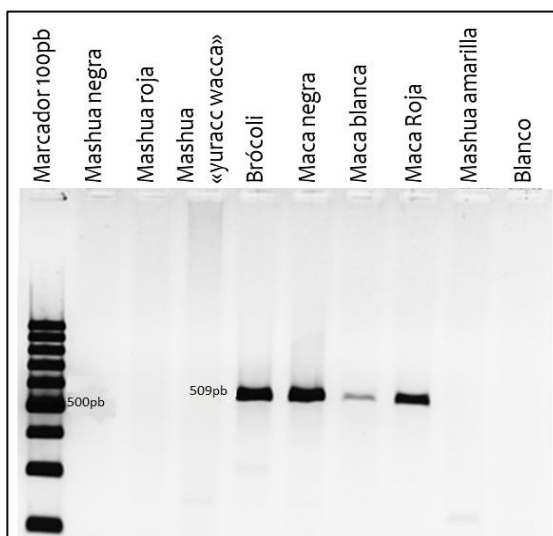


Figura 29. Amplificación del iniciador CYP83B1.3 en las muestras en estudio.

La temperatura de alineamiento empleada para el iniciador CYP83B1.4 fue de 55°C. Se observó una banda intensa de un tamaño aproximado de 596pb en la muestra de brócoli, que coincide con el fragmento buscado. Sin embargo, en las muestras de mashua y maca no se observaron bandas amplificadas (Figura 30).

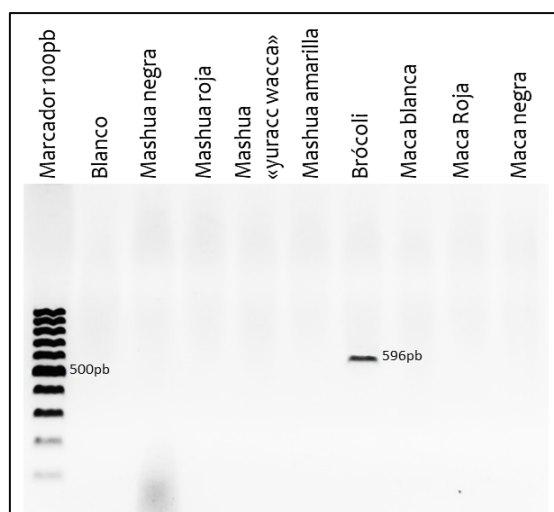


Figura 30. Amplificación del iniciador CYP83B1.4 en las muestras en estudio.

La temperatura de alineamiento a la que se amplificó el gen CYP83B1.5 fue de 53°C. Se observó una banda intensa de un tamaño aproximado de 510pb en la muestra de brócoli la que coincide con el fragmento buscado. Sin embargo, en las muestras de mashua y maca no se observaron ninguna banda amplificada (Figura 31).

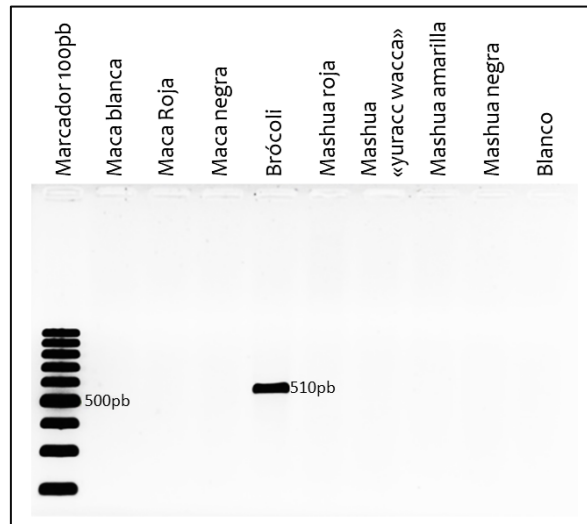


Figura 31. Amplificación del iniciador CYP83B1.5 en las muestras en estudio.

Todos los iniciadores diseñados amplificaron de manera eficiente en brócoli, a pesar de que los iniciadores R1 y R3 tenían la posibilidad de formar autodímeros y horquillas, y que el iniciador L1 presentó un alto porcentaje de guanina y citosina. Lo que indica que en una PCR convencional los parámetros podrían ser menos restrictivos.

A pesar de que el iniciador CYP83B1.2 presentaba más probabilidad de amplificar el fragmento esperado en *L. meyenii*, solo amplificó para el control positivo (brócoli). Sin embargo, el juego de iniciador CYP83B1.3 amplificó en brócoli y en las muestras de maca.

Construimos un árbol filogenético con el programa MEGA5 empleando el “Test *maximum Likelihood*”, con las secuencias codificantes del gen CYP83B1 (Figura 32). Observamos que existe una relación entre las distancias filogenéticas obtenidas por Covreur *et al.* (2010) a partir de un marcador mitocondrial, y la filogenia de los genes

de CYP83B1 que se encuentran en el núcleo de la célula; a pesar que estos últimos están expuestos a diversos cambios en la estructura de su genoma (Huang *et al.*, 2016).

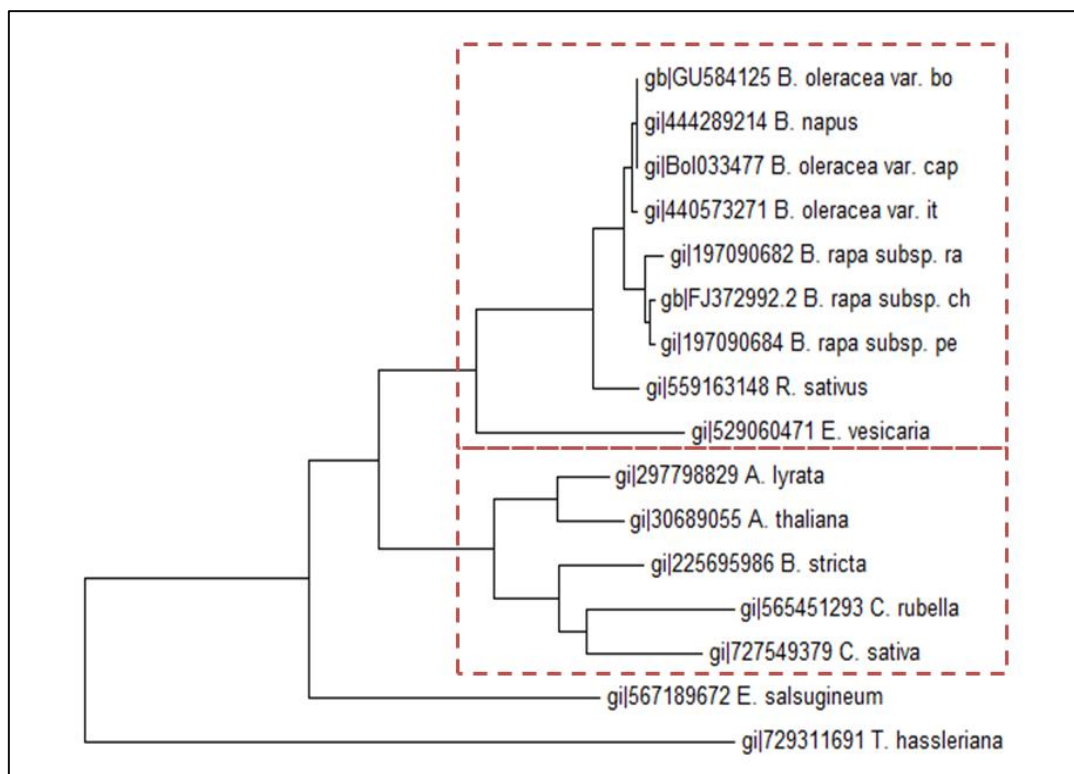


Figura 32. Árbol filogenético obtenido de las secuencias de genes de CYP83B1 por el método de máxima verosimilitud.

L. meyenii, filogenéticamente se encuentra relacionado a las especies del linaje I, por ende sus secuencia del gen CYP83B1 también deberían estar relacionadas. Al parecer la secuencia de los genotipos de maca evolucionaron de manera independiente en relación a las especies del linaje I de la familia Brassicaceae. Es probable que las zonas conservadas donde se diseñaron los iniciadores, que no pertenecen al juego de iniciadores CYP83B1.3, hayan sufrido una variación considerable, ya que un nucleótido variable no es suficiente para que no se amplifique el fragmento deseado.

No se obtuvo amplificadas para *T. tuberosum* con ningún iniciador, y puede ser que las diferencias en sus secuencias debió ser mayor; ya que filogenéticamente se encuentra incluso más alejada que *T. hassleriana*.

SUR1

La temperatura de alineamiento calculada para este gen es de 52°C. En las muestras de maca negra y brócoli se observan dos bandas de 814 y 901pb aproximadamente. En la maca roja se observa solo una banda bastante tenue, de tamaño similar a lo obtenido en brócoli (814pb) y en la maca blanca y los genotipos de mashua no se hallaron ningún amplificado (Figura 33).

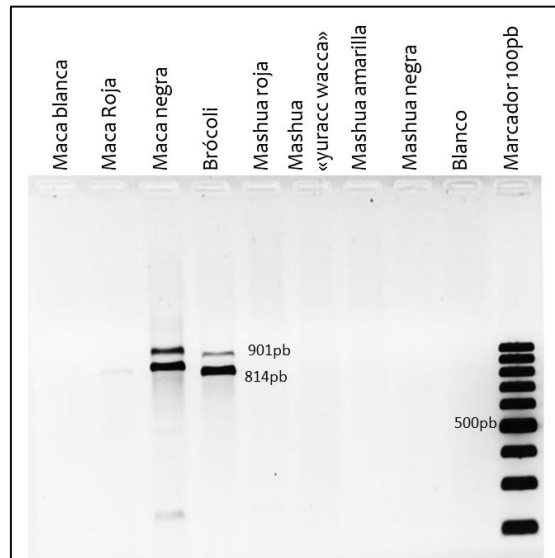


Figura 33. Amplificación del iniciador SUR1.1 en las muestras en estudio.

Este juego de iniciadores se alinea con las secuencias del gen SUR1 (C-S liasa) que se encuentran en los cromosomas 1 y 9 del genoma de *B. oleracea* var. capitata, donde se obtuvieron amplicones de 814pb y 901pb respectivamente, que coincide con los fragmentos obtenidos. Los iniciadores se diseñaron en base al gen SUR1 que se encuentra en el cromosoma 9 de *B. oleracea* var. Capitata; no se consideró su homólogo debido a las diferencias considerables que presentaba con las demás secuencias alineadas.

Las zonas codificantes de ambos genes SUR1 encontrados en *B. oleracea* var. Capitata, se alinearon en el programa BLAST, y dio como resultado que el 74 por ciento de homología, del 69 por ciento de la cobertura de consulta. En el secuenciamiento del genoma de *B. rapa*, también se identificaron dos genes de C-S liasa que tenían el 90%

de nucleótidos idénticos del 90 por ciento de la cobertura de consulta; estos genes se encontraron en los cromosomas 7 y 9 (Zang *et al.*, 2009). Se observa que los genes de *B. oleracea* var. *Capitata* presentaron mayor diferencia entre ellos, que los presentes a *B. rapa*; además la ubicación en los cromosomas no son los mismos en ambas especies, y puede ser debido a que después de su divergencia, en el transcurso de la evolución, existió un mayor reordenamiento del genoma en *B. oleracea* var. *Capitata* (Liu *et al.* , 2014).

Debido a que en maca negra se observan dos fragmentos similares a los del control, existe la probabilidad de que este genotipo presente dos homólogos del gen SUR1. Se observa también que los amplificadores obtenidos en los genotipos de maca son diferentes, a pesar de pertenecer a la misma especie no se mantuvieron conservadas las zonas donde se diseñaron los iniciadores. Por ello, podría decirse que las secuencias del gen SUR1 de los genotipos de maca, hayan sufrido diferencias en el transcurso de la evolución.

UGT74B1

La temperatura de alineamiento estandarizada para este gen es de 53°C. Se observó una banda intensa de un tamaño aproximado a la banda esperada, que es de 224pb, en el control positivo (brócoli) y en las muestras de maca (figura 34).

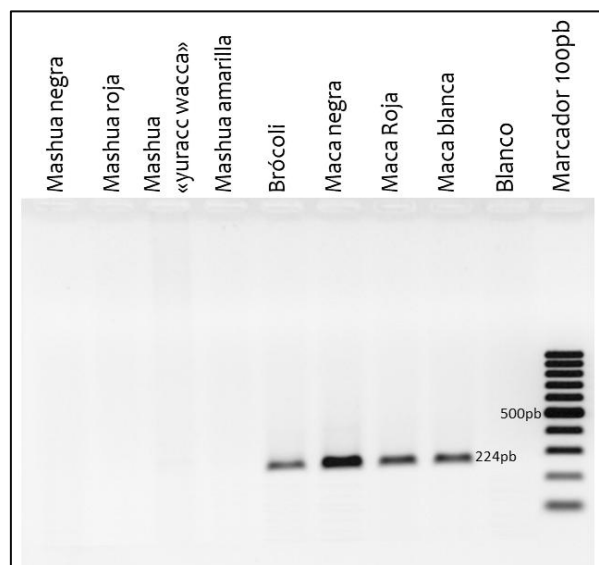


Figura 34. Amplificación del iniciador UGT74B1.1 en las muestras en estudio.

El juego de iniciadores solo amplificó en las muestras de maca y brócoli. En el alineamiento múltiple de las secuencias en la zona donde se diseñó el iniciador L, se observa hasta cinco nucleótidos de diferencia con *T. hassleriana*, por lo que podríamos asumir que en *T. tuberosum* que pertenece a una familia mucho más alejada, presente una diferencia aún mayor en esa zona (Figura 12).

4.3.2.2. Amplificación de fragmentos con los iniciadores degenerados

Para verificar que los iniciadores degenerados amplifiquen el fragmento deseado, se realizó PCR touchdown; el cual trabaja a diferentes temperaturas de alineamiento, con el fin de poder seleccionar con rapidez los juegos que nos ayudaran a obtener los posibles fragmentos del gen de interés.

Tabla 14: Mezcla de reacción para la amplificación de iniciadores degenerados por PCR (Master mix) .

Reactivo	Concentración inicial	Cantidad por reacción (µL)
Agua libre de nucleasas (NFW)		4.55
PCR buffer	10X	1
MgCl	50mM	0.6
Dntps	5mM	0.6
Iniciador sentido	20uM	0.50
Iniciador antisentido	20uM	0.50
Taq polimerasa (marca)	5 U/µl	0.25
ADN molde	20ng/uL	2
Volumen final		10 uL

Primero, se realizó una prueba de amplificación para todos los iniciadores, donde se empleó el master mix y el perfil de temperatura obtenido en los iniciadores simples, a excepción de la temperatura de alineamiento (TA) que se trabajó inicialmente con lo obtenido *in silico* (tabla 3, tabla 4, tabla 5, tabla 6, tabla 7, tabla 8, tabla 9 y tabla 10). En el PCR touchdown se programó el perfil de temperatura, con una temperatura de alineamiento que en algunos casos iba desde una temperatura de alineamiento hallado *in silico* hasta diez grados por debajo de esa temperatura. De esta manera podíamos hacer

la amplificación más inespecífica, obtener amplificadores e ir ajustándolos estrechando el rango de TA (o cambiando parámetros del master mix o número de ciclos en el perfil de temperatura de ser necesarios), o en su defecto descartarlos (tabla 14 y 15).

Tabla 15: Programa de PCR *touchdown* para los iniciadores degenerados.

Etapas de amplificación	Temperaturas	tiempo	Ciclos
Denaturación inicial	95°C	5'	1
Denaturación	95°C	1 ⁻²	“n” veces ³
Hibridación	TA _i ¹	1 ⁻²	
Extensión	72°C	1 ⁻²	
Denaturación	94°C	1 ⁻²	35 veces
Hibridación	TA _f ¹	1 ⁻²	
Extensión	72°C	1 ⁻²	
Extensión final	72°C	7'	1

¹Rango de temperatura de alineamiento (TA_i- TA_f): CYP79A2.1d, CYP79A2.2d, CYP83A1.1d, CYP83B1.1d, CYP83B1.2d, CYP83B1.4d, CYP83B1.5d, CYP83B1.6d, UGT74B1.1d: 59°C-50°C; CYP83A1.2d: 57°C-48°C CYP83A1.3d: 60°C-52°C CYP83A1.4d, UGT74B1.2d: 62°C-58°C; CYP83B1.3d: 62°C-57°C.

² Para el iniciador UGT74B1.2d se empleó el tiempo de 1'30''.

TA_i¹: Temperatura de alineamiento inicial/ TA_f¹: Temperatura de alineamiento final

³ Para todos los iniciadores degenerados se programó un decremento de temperatura de 1°C. Por ende el número de ciclo para cada juego de iniciadores se halló TA_f¹-TA_i¹+1

CYP79A2

El juego de iniciadores de CYP79A2.1d y CYP79A2.2d, fueron probados para amplificar en un rango de temperaturas de alineamiento de 59°C a 50°C (Tabla 15). Sin embargo, no mostraron ninguna banda amplificada y fueron descartados (figura 35).

Los iniciadores CYP79A2.2d, presentaron una alta probabilidad de formar heterodímeros; y autodímeros u horquillas con el iniciador L2, durante la PCR. Sin embargo, no se ha podido determinar el motivo que evito que se amplifiquen los iniciadores de CYP83A1.1d.

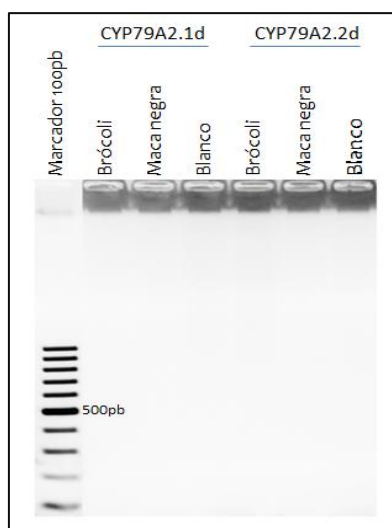


Figura 35. Prueba de amplificación de los iniciadores CYP79A2.1d y CYP79A2.2d en una muestra de estudio de ambas especies.

CYP83A1

El juego de iniciadores de CYP83A1.1d se amplificó a temperaturas de alineamiento de 59°C a 50°C (Tabla 15). La banda deseada es de 194pb en la muestra de brócoli, sin embargo, se observó dos bandas, una con similar tamaño a la banda de interés y la otra banda de mayor peso a lo esperado, siendo de 40 a 50pb más aproximadamente. Además en maca negra se observa una banda similar al tamaño esperado y una banda de 120pb aproximadamente (Figura 36).

En la electroforesis de CYP83A1.1d se observan dos bandas amplificadas, que pertenecen al gen, ya que el iniciador L1 se ancla en dos partes distintas de la secuencia (Tabla 5). Al parecer en el brócoli el iniciador L1 es más afín entre la posición 379 y 398 pb (zona 1) que es la zona donde se diseñó el iniciador, y en maca tiene más similitudes con una zona que se encuentra entre 334 y 353 pb (zona 2), ambas ubicadas en el primer exón. El iniciador L1 ubicado en la zona 1 y 2, junto con el iniciador R dan un tamaño de amplicon de 194 y 239pb respectivamente. Con estos resultados podríamos señalar que este gen podría ser parte de la ruta de la biosíntesis de glucosinolatos aromáticos en maca.

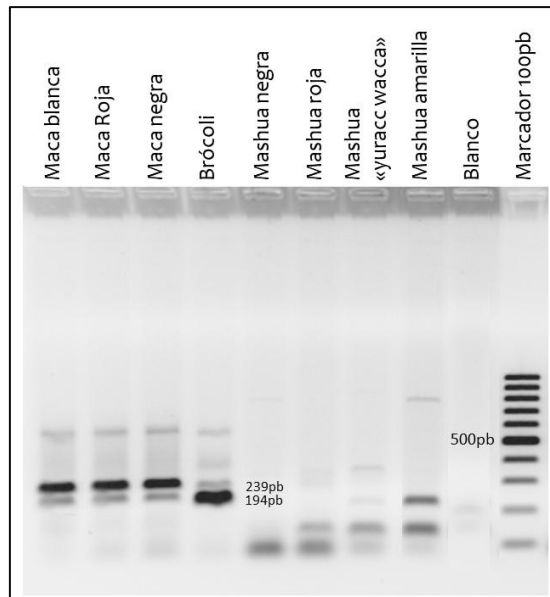


Figura 36. Amplificación del iniciador CYP83A1.1d en las muestras en estudio.

En la mashua amarilla también se observa una banda de unos 194pb aproximadamente, pero no se observa esa segunda banda formada en las muestras de maca y brócoli, además se obtuvo amplificadas de la misma intensidad con un tamaño alrededor de 120pb. Esas dos bandas podrían corresponder a fragmentos del gen, lo que indicaría una inserción y delección de ADN en la zona de los fragmentos obtenidos. Sin embargo, debido a la variación con el tamaño obtenido en nuestro control, se prefirió no considerarlo como posible fragmentos correspondientes al gen.

Para los iniciadores CYP83A1.2d se empleó la temperaturas de hibridación de 57°C a 48°C (Tabla 15). El tamaño esperado de la banda en brócoli fue de 237pb, se observa bandas muy pronunciadas en aproximadamente 250pb por lo que se espera que sea la banda de interés; sin embargo, en la muestra de mashua roja se observa una banda poco tenue y de menor peso, y en las demás muestras no se evidencia banda alguna (Figura 37).

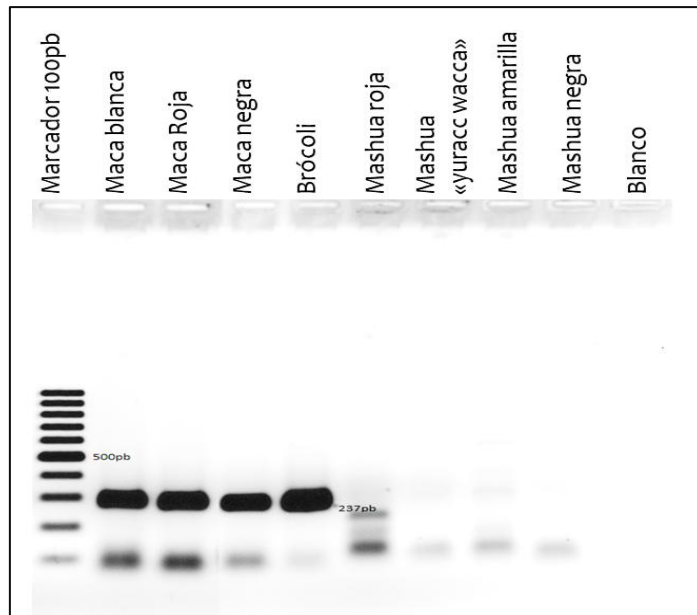


Figura 37. Amplificación del iniciador CYP83A1.2d en las muestras en estudio.

Para obtener el fragmento deseado dado por el par de iniciadores CYP83A1.3d, se trabajó con temperaturas de alineamiento que van desde los 60°C hasta los 52°C (Tabla 15). Las bandas obtenidas en las muestras de brócoli y maca se acercan a los 267pb que corresponden al tamaño deseado, a excepción de la maca negra que la banda se encuentra entre los 300 y 400pb. En las muestras de mashua no se detecta una banda definida (Figura 38).

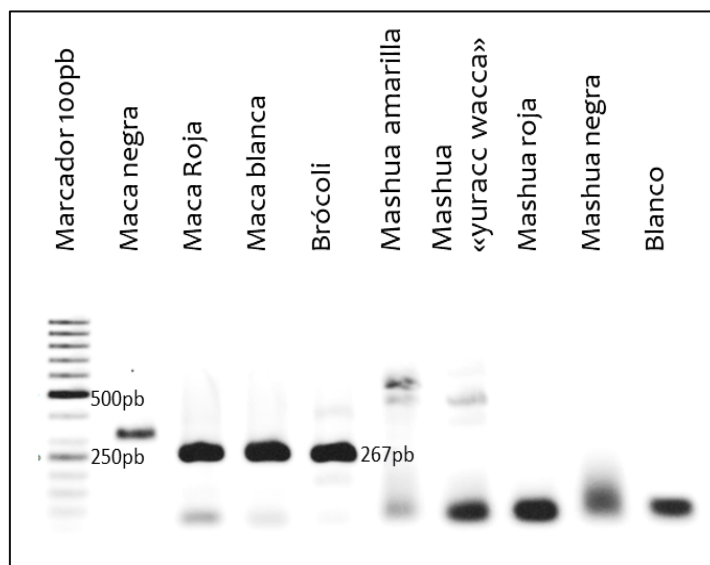


Figura 38. Amplificación del iniciador CYP83A1.3d en las muestras en estudio.

Debido a que la banda obtenida en brócoli presenta un tamaño similar a lo esperado, es probable que corresponda al fragmento deseado. Igualmente, los fragmentos obtenidos en los genotipos de maca blanca y roja serían los correspondientes al gen CYP83A1. Sin embargo, en el genotipo de maca negra amplificó un fragmento de aproximadamente 300pb, esto podría deberse a diferencias en la secuencia nucleotídica presente en la zona conservada donde se diseñó el iniciador degenerado.

Para el fragmento CYP83A1.4d se empleó la temperatura de alineamiento que va desde los 62°C hasta los 58°C (Tabla 15). El tamaño del fragmento deseado es de 441pb y en nuestro control positivo, que es el brócoli, se observa una banda muy definida que tiene el tamaño esperado. Las muestras de maca tienen una banda específica de un tamaño similar a lo obtenido en brócoli, sin embargo en las muestras de mashua no se observa amplificadas (Figura 39).

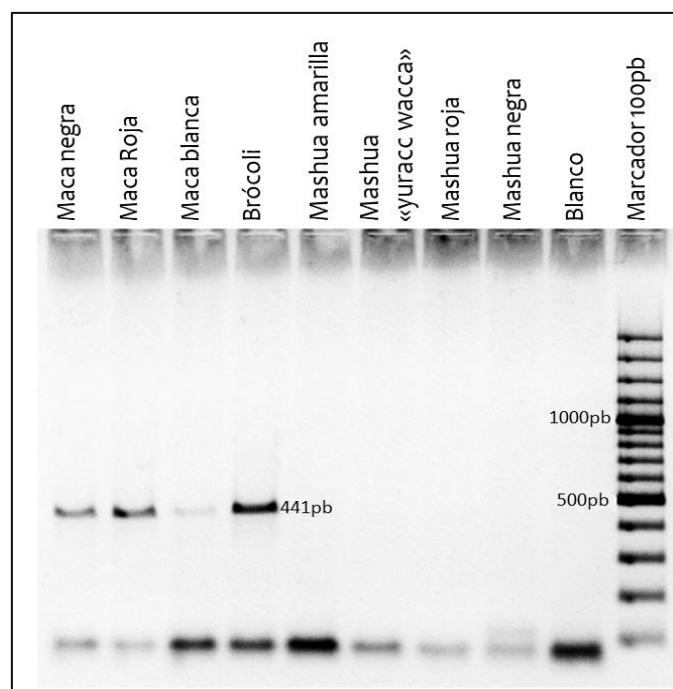


Figura 39. Amplificación del iniciador CYP83A1.4d en las muestras en estudio.

FUENTE: propia.

A pesar que los iniciadores CYP83A1.1d, CYP83A1.2d, CYP83A1.3d y CYP83A1.4d, presentaron la probabilidad de formar dímeros u horquillas, estos amplificaron de manera eficiente en el control.

Los iniciadores degenerados diseñados para este gen amplificaron fragmentos del tamaño esperado en los genotipos de maca; sin embargo, no se pudo obtener amplificados en mashua.

CYP83B1

Para el juego de iniciadores CYP83B1.1d, se emplearon temperaturas de alineamiento desde 59°C a 50°C (Tabla 15). Las bandas obtenidas en las muestras de brócoli y maca fueron de un tamaño es similar al esperado, que es de 261pb. No se observa amplificados en las muestra de mashua (Figura 40).

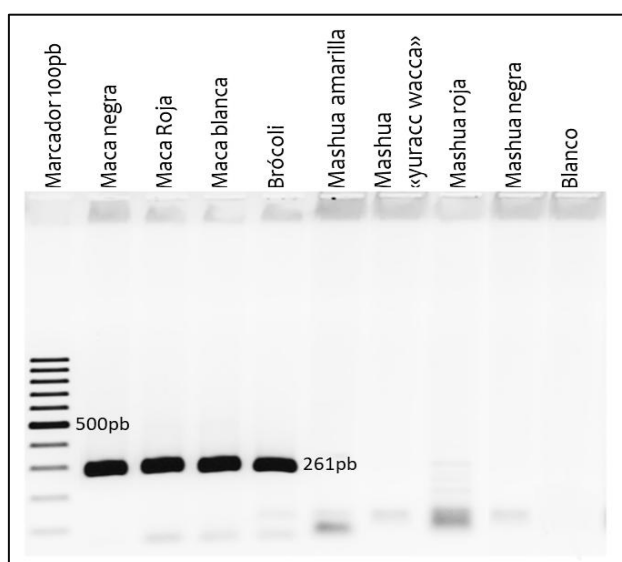


Figura 40. Amplificación del iniciador CYP83B1.1d en las muestras en estudio.

Para los iniciadores CYP83B1.2d, se emplearon temperaturas de alineamiento que van desde los 59°C hasta los 50°C (Tabla 15). Sin embargo, dichos iniciadores no amplificaron la banda de interés en el control ni en las muestras en estudio, solo se observaron artefactos y bandas en la base que pueden corresponder a los iniciadores del master mix (Figura 41). Esto pudo ser debido a que los iniciadores hayan formado homodímeros u horquillas entre los iniciadores R2.

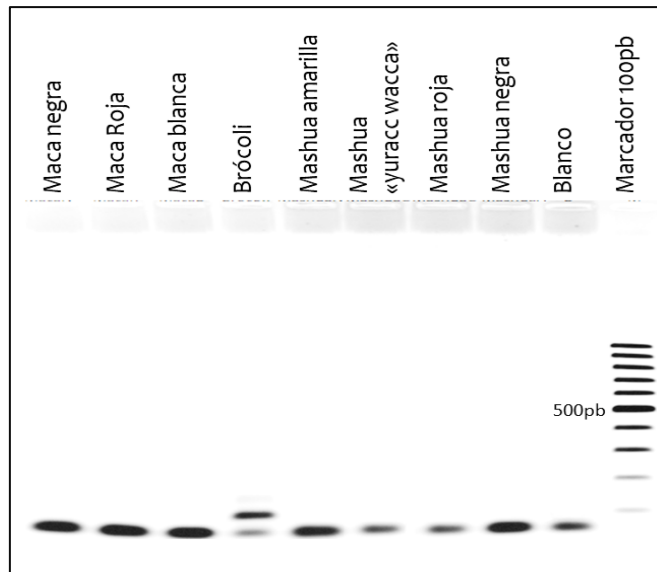


Figura 41. Amplificación del iniciador CYP83B1.2d en las muestras en estudio.

Para los iniciadores CYP83B1.3d, se emplearon temperaturas de alineamiento que van desde los 62°C hasta los 57°C (Tabla 15). En la muestra de brócoli se observa una banda específica y de tamaño similar al esperado, y en la muestra de maca negra también se obtuvo un tamaño similar a la del brócoli pero fue muy tenue. En las muestras de mashua se obtuvieron bandas de 700pb y 300pb aproximadamente, a excepción de la muestra de mashua roja que tuvo una banda de 300pb (Figura 42).

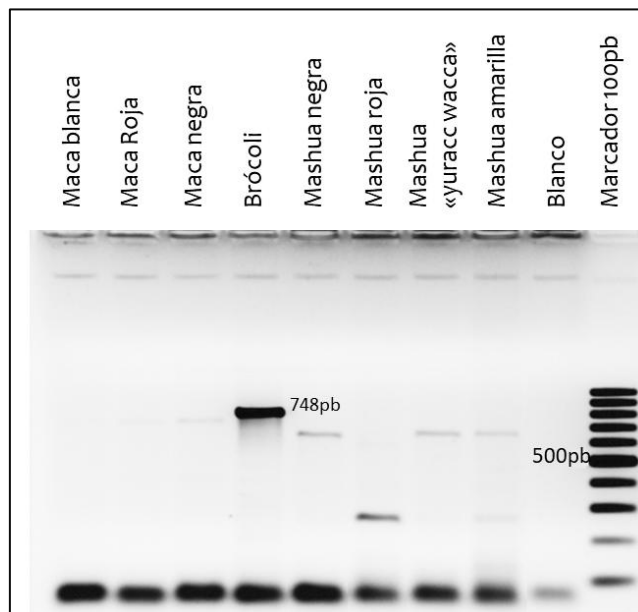


Figura 42. Amplificación del iniciador CYP83B1.3d en las muestras en estudio.

Los iniciadores degenerados CYP83B1.3d amplificaron una banda tenue en el genotipo de maca negra y ningún amplificado en los genotipos de maca roja y blanca. En los genotipos de mashua se obtuvo fragmentos de 700 y 300pb, que podrían corresponder al gen; sin embargo, por las diferencias en el tamaño del amplicón no se le considero como un posible fragmento del gen.

En el juego de iniciadores CYP83B1.4d, se emplearon temperaturas de alineamiento que van desde los 59°C hasta los 50°C (Tabla 15). En las muestras de brócoli y maca se observa una banda similar al fragmento esperado, que se asemeja al tamaño esperado del fragmento, que es de 1014pb (Figura 43). No se observa amplificado en las muestra de mashua.

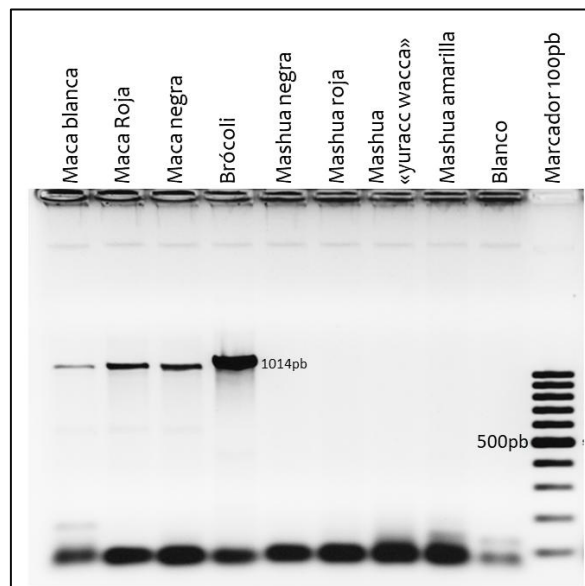


Figura 43. Amplificación del iniciador CYP83B1.4d en las muestras en estudio.

Los iniciadores CYP83B1.5d se amplificaron con temperaturas de alineamiento que van desde los 59°C hasta los 50°C (Tabla 15). El fragmento amplificado en brócoli, es muy similar a la banda esperada que es de 793pb; sin embargo, en las muestras en estudio no se observó amplificados (Figura 44).

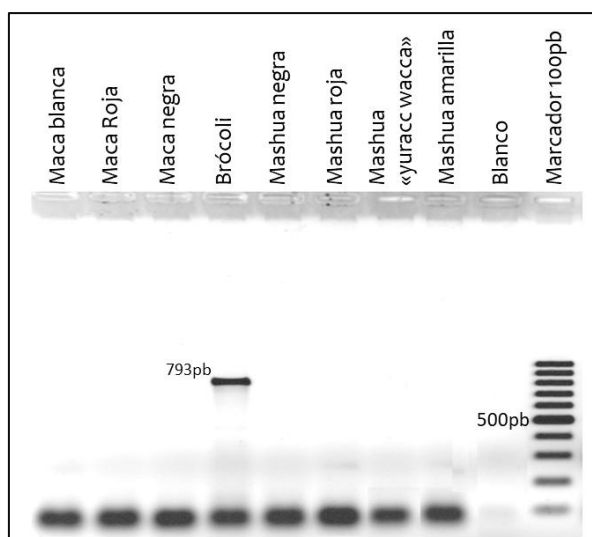


Figura 44. Amplificación del iniciador CYP83B1.5d en las muestras en estudio.

Los iniciadores CYP83B1.6 se amplificaron a temperaturas de alineamiento que van desde 59°C hasta los 50°C (Tabla 15). Se observó una banda específica en la muestra de brócoli con un tamaño mayor a la banda esperada que es de 966pb (Figura 45). No se observó amplificación alguna en las muestra de maca y mashua.

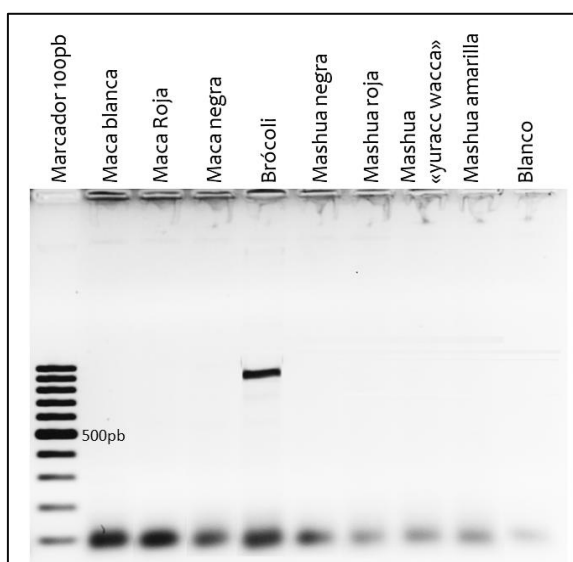


Figura 45. Amplificación del iniciador CYP83B1.6d en las muestras en estudio.

Los juegos de iniciadores CYP83B1.1d, CYP83B1.3d, y CYP83B1.4d amplificaron el tamaño del fragmento esperado en nuestro control, por lo que es probable que los fragmentos amplificados en maca que tienen el mismo tamaño, pertenezcan al gen

CYP83B1. Sin embargo, los iniciadores CYP83B1.5 y CYP83B1.6 no amplificaron para en los genotipos de maca ni mashua, lo que sugiere que esas zonas no se mantuvieron conservadas.

UGT74B1

El juego de iniciadores UGT74B1.1d se amplificaron en un rango de temperatura de alineamiento que van desde 59°C hasta los 50°C (Tabla 15). El tamaño del fragmento obtenido en el control es similar al fragmento esperado de 260pb, que podría corresponder al fragmento esperado del gen, al igual que los fragmentos obtenidos en los genotipos de maca y mashua de similar tamaño. (Figura 46). Además, en las muestra de mashua “yuracc wacca” y amarilla, se observa una banda tenue de unos 750pb aproximadamente que podría corresponder a un fragmento de un gen homólogo.

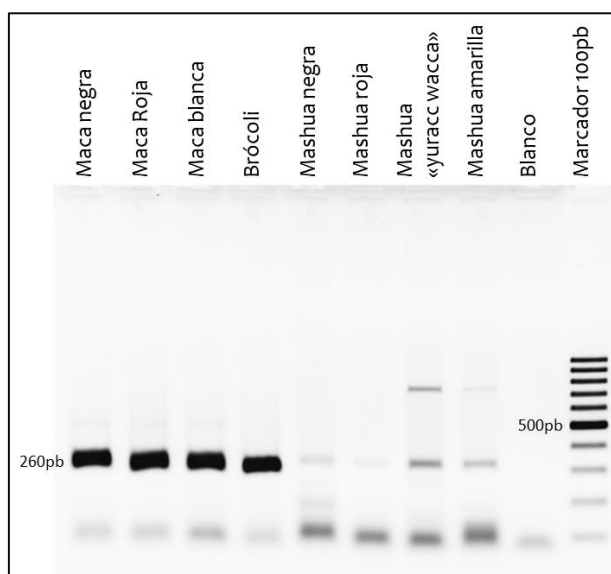


Figura 46. Amplificación del iniciador UGT74B1.1d en las muestras en estudio.

Los iniciadores UGT74B1.2d se amplificaron a temperaturas de alineamiento que van desde 62°C hasta los 58°C. En el control, se halló una banda tenue con un similar tamaño a lo esperado (1367pb), además amplificó un fragmento de 1000pb aproximadamente (Figura 47). No se observó amplificados en las muestras de maca y mashua.

El iniciador UGT74B1.2d solo amplificó para el control, lo que indica que en las muestras de maca y mashua la zona donde se diseñaron los iniciadores pudo haber variado en el transcurso de la evolución. No se pudo identificar a que gen pertenece la secuencia de aproximadamente 1000pb que se amplificó en el brócoli.

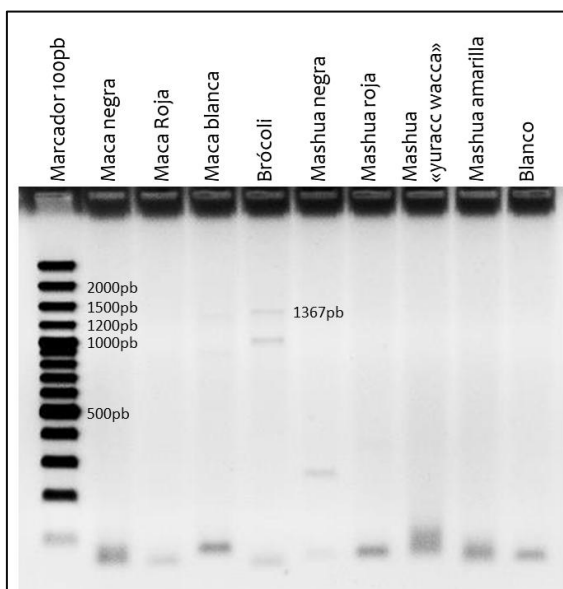


Figura 47. Amplificación del iniciador UGT74B1.2d en las muestras en estudio.

De todos los iniciadores diseñados y verificados, solo algunos lograron amplificar fragmentos similares a lo esperado (Tabla 18). La mayoría de iniciadores que amplificaron los fragmentos de interés, obtuvieron la banda específica y por lo general era el único amplificado, por lo que fue fácil identificarlo. Por lo menos en un juego de iniciadores por gen logró amplificar el fragmento esperado en todas las muestras de maca, a excepción del gen SUR1 que no se obtuvo el fragmento deseado en la muestra de maca blanca. En las muestras de mashua se obtuvieron fragmentos esperados con los iniciadores degenerados UGT74B1.1d.

Continuación...

Iniciador	Tipo de iniciador ³	Tamaño del fragmento esperado	Numero de banda amp.	Brócoli (control positivo)		Maca						Mashua							
						blanca		roja		negra		amarilla		"yuracc wacca"		roja		negra	
				T ¹	P ²	T ¹	P ²	T ¹	P ²	T ¹	P ²	T ¹	P ²	T ¹	P ²	T ¹	P ²	T ¹	P ²
CYP83B1.2d	D	333	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
CYP83B1.3d	D	765	1	748	si	748	si	-	-	-	-	700	no	700	no	300	no	700	no
CYP83B1.4d	D	1014	1	1014	si	1014	si	1014	si	1014	si	-	-	-	-	-	-	-	-
CYP83B1.5d	D	795	1	793	si	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CYP83B1.6d	D	966	1	966	si	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SUR1.1	S	901	1	901	si	-	-	-	-	901	si	-	-	-	-	-	-	-	-
		814	2	814	si	-	-	814	si	814	si	-	-	-	-	-	-	-	-
UGT74B1.1	S	224	1	224	si	224	si	224	si	224	si	-	-	-	-	-	-	-	-
UGT74B1.1d	D	260	1	300	si	300	si	300	si	300	si	300	si	300	si	300	si	300	si
			0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	750	no	-	-	-
UGT74B1.2d	D	-	1	1000	no	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		1367	2	1367	Si	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

¹ Tamaño aproximado del fragmento

² Basándonos en el tamaño del fragmento obtenido ¿Existe una alta probabilidad de que la banda corresponda al fragmento esperado?

³ D: corresponde a iniciador degenerado y S: corresponde a iniciador simple

V. CONCLUSIONES

- En el alineamiento de las secuencias codificantes completas, se observó un alto porcentaje de similitud entre las secuencias de los genes CYP79A2, CYP83A1, CYP83B1, SUR1, UGT74B1 y ST5a, dentro de la familia Brassicaceae.
- Se obtuvo iniciadores para todos los genes a excepción de ST5a. En la mayoría de los casos un iniciador se empleó para diferentes juegos de iniciadores previa evaluación. Además, algunos iniciadores no cumplieron en totalidad por lo recomendado por los autores como: tamaño de iniciador (17pb en CYP79A2.1), porcentaje de GC (mayor a 60% en los iniciadores CYP83B1.1, CYP83B1.2 y CYP83B1.3), y complementariedad mayor a 4 nucleótidos entre los iniciadores; sin embargo, se decidió poner a evaluación.
- Los iniciadores que no cumplieron en su totalidad con los parámetros recomendados por los autores amplificaron los fragmentos esperados de forma específica. La mayoría de iniciadores diseñados que obtuvieron amplificados, mostraron especificidad.
- Se proponen doce iniciadores para amplificar posibles fragmentos correspondientes a los genes de la ruta biosintética de glucosinolatos aromáticos en maca; además un par de iniciadores para amplificar un fragmento del gen UGT74B1 en genotipos mashua.

VI. RECOMENDACIONES

- Emplear los iniciadores propuestos, en otras especies que contengan glucosinolatos
- Secuenciar los fragmentos encontrados para conocer el porcentaje de homogeneidad con otras especies.
- Realizar estudios de expresión de los genes de los cuales se pudieron encontrar los fragmentos mediante los iniciadores diseñados.

VII. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

- AGERBIRK, N. y OLSEN C. 2012. Corrigendum to Glucosinolate structures in evolution. *Phytochemistry* 77: 16-45.
- AI, Z.; CHENG, A.; YU.; YU, L.; JIN, W. 2014. Antidepressant-Like behavioral, Anatomical, and Biochemical effects of Pretroleum Ether Extract from Maca (*Lepidium meyenii*) in mice exposed to chronic unpredictable mild stress. *Journal of Medicinal Food* 17(5): 535-542.
- ALZAMORA, L., COLONA, E., ACERO DE MESA, N., GALÁN DE MERA, A., MINGARRO, D., LINARES, F., DOMINGUEZ, M y ÁLVAREZ, E. 2007. Efecto citotóxico del extracto metanólico de tres ecotipos de *Lepidium peruvianum* Chacón on cellular lines HeLa and HT-29. *Rev. Perú. biol.* 13(3):219-221.
- ARIAS, M. 2011. Análisis y comparación de los glucosinolatos presentes en diferentes accesiones de cubio (*Tropaeolum tuberosum*) para evaluar su uso potencial en el control del patógeno de la papa *Spongospora subterranea*. Tesis MAg. Sc. Bogota, CO, Universidad Nacional de Colombia. 122 p.
- ARTEAGA, F. 2009. Ficha tecnica mashua, *Tropaeolum tuberosum*. Red peruana de alimentación y nutrición. monografía 058
- ARUQUIPA, R. 2016. El isaño (*Tropaeolum tuberosum*) un cultivo de consumo y medicina tradicional en Huatacana para el beneficio de la población boliviana. *RIIARn* 3(2): 146-151.
- BAZINET, A. 2015. Clustal X (en línea). Consultado 15 set. 2015. Disponible en: <http://www.molcularevolution.org/software/alignment/clustal>
- Boletín de información estadística agraria. 2012. Tubérculos y raíces. (En línea). Puno, PE. Consultado 2 jun. 2014. Disponible en http://www.agropuno.gob.pe/sites/default/files/estadistica/boletines/boletin_tuberculos_2012.pdf

- BONES, A.; IVERSEN, T. 1985. Myrosin cells and myrosinase. *Israel Journal of botany*. 34:2-4.
- BONES, A.; THANGSTAD, O.; HAUGEN, O.; ESPEVIK, T. 1991. Fate of myrosin cells: Characterization of monoclonal antibodies against myrosinase. *Journal of Experimental Botany* 42(245): 1541-1549.
- BRACK EGG, A. 1999. *Diccionario Enciclopédico de Plantas Útiles del Perú*; Centro de Estudios Regionales, Andinos Bartolomé de las Casas. Cusco.
- BRUNEL, D; FROGER, N; PELLETIER, G. 1999. Development of amplified consensus genetic markers (ACGM) in *Brassica napus* from *Arabidopsis thaliana* sequences of known biological function. *Genome* 42: 387-402.
- BUXDORF, K., YAFFE, H., BARDA., O. y LEVY, M. 2013. The effects of glucosinolates and Their Breakdown Products on Necrotrophic Fungi. *PLoS ONE* 8(8): e70771.
- CADAVID, I.; ROSERO, D. y URIBE S. 2013. Comparación de dos métodos de extracción de ADN a partir de plantas del género *Solanum*, subgénero *Leptostemonum*. *Rev. Colomb. Biotecnol.* 15(2):186-192.
- CADIMA, X. 2006. Tubérculos. *Botánica Económica de los Andes Centrales*. 347-369.
- Capitulo 3
- CARDENAS-VALENCIA, I.; NIETO, J.; GASCO, M.; GONZALES, C.; RUBIO, J.; PORTELLA, J.; GONZALES, G. 2008. *Tropaeolum tuberosum* (mashua) reduces testicular function: effect of different treatment times. *Andrología* 40: 352-357.
- CASTAÑEDA, A. sf. Evaluación de la producción tradicional del cultivo de isaño (*Tropaeolum ruberosum* Ruiz y Pavón) identificando sus potencialidades y limitaciones en la seguridad alimentaria. (correo electrónico). Lima, PE (e-mails: adela.lacteos@gmail.com).
- CASTAÑO, P. 2008. Maca (*Lepidium peruvianum* Chacón): composición química y propiedades farmacológicas. *Revista de Fitoterapia* 8(1):21-28.
- CHACÓN, G. 1990. La maca (*Lepidium peruvianum* Chacón sp. nov.) y su habitat. *Rev. Per. Biol.* 3(2):169-272.
- CHEN, S; PETERSEN, L; OLSEN, C; SCHULZ, A; HALKIER, B. 2001. Long-distance phloem transport of glucosinolate in *Arabidopsis*. *Plant physiology* 127: 194-201.

- CHENNA, R; SUGAWARA, H; KOIKE, T; LOPEZ, R; GIBSON, TJ; HIGGINS, DG y THOMPSON JD. 2003. Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. *Nucleic Acids Research* 31(13): 3497-3500.
- COUVREUR, T; FRANZKE, A; AL-SHEHBAZ, I; BAKKER, F; KOCH, M; MUMMENHOFF, K. 2010. Molecular phylogenetics temporal diversification and principles of evolution in the mustard family (Brassicaceae). *Mol. Biol. Evol.* 27(1): 55-71.
- CRUZ, J.; VALVERDE, M. y YBAÑEZ, R. 2017. Efecto del extracto acuoso de *Tropaeolum tuberosum* “mashua” sobre el deterioro de la memoria y lipoperoxidación inducida con fluxetina en hígado en *Rattus rattus* var. albinus ooforectomizadas. *Revista Peruana de Medicina Integrativa* 2(2): 119-25.
- DALGAARD, M.; LARSEN, B.; GLAWISCHNING, E.; BEGH, A.; ANDREASSON, E. y HALKIER, B. 2003. Modulation of CYP79 genes and glucosinolate profiles in *Arabidopsis* by defense signaling pathways. *Plant Physiology* 131: 298-308.
- DINI, I.; TENORE, G. y DINI, A. 2002. Glucosinolates from Maca (*Lepidium meyenii*). *Biochemical Systematics and Ecology* 30: 1087-1090.
- DOSTERT, N., ROQUE, J., CANO, A., LA TORRE, M y WEIGEND, M. 2009. Factsheet: Datos botánicos de Maca. F Luebert. 1. Ed. Lima, PE. Imprenta nacional. 11p.
- DOYLE JJ, y DOYLE JL. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem Bull* 19:22-15
- ESPINOSA, P., VACA, R., ABAD, J. y CRISSMAN, CH. 1996. Raíces y tubérculos andinos marginados en el Ecuador, situación actual y limitaciones para la producción. Quito, EC. CIP. 182 p.
- FAHEY, J.; ZALCMANN, A. y TALALAY, P. 2001. The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants. *Phytochemistry* 56: 5-51.
- FIELD, B.; CARDON, G.; TRAKA, M.; BOTTERMAN, J.; VANCANNEYT, G.; MITHEN, R. 2004. Glucosinolate and Amino Acid Biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 135: 828-839.
- FLORES, MERCEDES. 2016. Consulta. (correo electrónico). Lima, PE, Universidad Nacional Agraria la Molina. (e-mails: mflores@lamolina.edu.pe).

- GIORGIO, ERNESTO M. s.f. Introducción al diseño de *primers* (en línea). Consultado 15 set. 2015. Disponible en: <http://www.aulavirtual-exactas.dyndns.org/claroline/backends/download.php?url=L0Z1bmRhbWVudG9zX3Rl83JpY29zX2RlX2xhX3JlYWNjafNuLnBkZg%3D%3D&cidReset=true&cidReq=BIOINFO>
- GÓMEZ, D., RODRIGUEZ-DELFIIN, A. y FERNANDEZ, E. 2000. Análisis de crecimiento e plantas de mashua (*Tropaeolum tuberosum*) sometidas a condiciones marginales. Anales científicos UNALM vol. XLIII: 283-299.
- GONZALES, C.; CARDENAS-VALENCIA, I.; LEIVA-REVILLA, J.; ANZARAMIREZ, C., RUBIO, J.; GONZALES, GF. 2010. Effects of different varieties of maca (*Lepidium meyenii*) on bone structure in ovariectomized rats. *Forsch Komplementmed* 17(3): 137-43.
- GONZALES, G., CÓRDOVA, A., VEGA, K., CHUNG, A., VILLENA, A. y GÓÑEZ, C. 2003. Effect of *Lepidium meyenii* (Maca), a root with aphrodisiac and fertility-enhancing properties. on serum reproductive hormone levels in adult healthy men. *Journal of Endocrinology* 176: 163-168.
- GONZALES, G., NIETO, J., RUBIO, J. y GASCO, M. 2006. Effect of Black maca (*Lepidium meyenii*) on one spermatogenic cycle in rats. *Andrología* 38: 166-172.
- GONZALES, M. 2008. Transformación genética de *Solanum tuberosum* cv. Desire por la introducción y expresión de los genes de la C-S liasa, glucosiltransferasa, y producción indirecta de glucosinolatos. Lima, Perú. Tesis MgSc mejoramiento genético de plantas. Universidad Nacional Agraria la Molina.
- GRAU, A., ORTEGA, R., NIETO, C. y HERMANN, M. 2003. Mashua, *Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pav. IPGRI.
- GRUBB, C., ZIPP, B., LUDWIG-MÜLLER, J., MASUNO, M., MOLINSKI, T. y ABEL, S. 2004. Arabidopsis glucosyltransferase UGT74B1 functions in glucosinolate biosynthesis and auxin homeostasis. *The Plant Journal* 40: 893-908.
- GRUBB, D. y ABEL, S. 2006. Glucosinolate metabolism and its control. *Plant Science* 11(2).
- HALKIER, B. y DU, L. 1997. The biosynthesis of glucosinolates. Elsevier Science Ltd 2(11).

- HALKIER, B. y GERSHENZON, J. 2006. Biology and biochemistry of glucosinolates. *Annu. Rev. Plant Biol.* 57, 303-333.
- HARA, M; FUJII, Y; SASADA, Y; KUBOI, T. 2000. cDNA Cloning of Radish (*Raphanus sativus*) Myrosinase and tissue-specific expression in root. *Plant Cell Physiol* 41 (10): 1102 - 1109.
- HUAMANÍ, K. 2009. Desarrollo de marcadores microsatelites en *Tropaeolum tuberosum* R&P ("mashua"). Tesis MgSc Mejoramiento genético en plantas. Lima, Perú. Universidad Nacional Agraria la Molina.
- HUAMANÍ, K. 2009. Identificación de genes candidatos para la biosíntesis y degradación de glucosinolatos mediante herramientas bioinformáticas. Tesis Biología celular y genética. Lima, Perú. Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
- HUANG, C.; SUN, R.; HU, Y.; ZENG, L.; ZHANG, N.; CAI, L.; ZHANG, Q.; KOCH, M.; AL-SHEHBAZ, I.; EDGER, P.; PIRES, J.; TAN, D.; ZHANG, Y. y MA, H. 2016. Resolution of Brassicaceae phylogeny using nuclear genes uncovers nested radiations and supports convergent morphological evolution. *Mol. Biol. Evol.* 33(2):397-412.
- HUSEBYE, H., CHADCHAWAN, S., WINGE, P., THAGSTAD, O. y BONES, A. 2002. Guard cell-and phloem idioblast specific expression of thioglucosidase glucohydrolase (myrosinase) in Arabidopsis. *Plant Physiology* 128: 1180-1188.
- HYE, E.; IL, J.; YOUNG, J.; HO, S.; SEOK, T.; HYUN, I.; SOOK, H. 2012. Supplementation of standardized lipid-soluble extract from maca (*Lepidium meyenii*) increases swimming endurance capacity in rats. *Journal of functional foods* 4: 568-573.
- IMISCH, S; McCORNICK, A; BOECKLER, A; SCHMIDT, A; REICHEL, M; SCHNEIDER, B; BLOCK, K; SCHNITZLER, J; GERSHENZON, J; UNSICKER, S; KÖLLNER, T. 2013. Two herbivore-induced cytochrome P450 enzymes CYP79D6 y CYP79D7 catalyze the formation of volatile aldoximes involved in poplar defence. *The plant cell* 25: 4737-4754.
- INIA. 2006. Compendio manejo tradicional de semillas de los cultivos nativos del Perú.
- JOHNS, T. 1981. The ñu and the maca. Division of Biological and Museum of Anthropology.

- KATO H. y STANDLEY D. 2013. MAFFT Multiple sequence Alignment Software versión 7: Improvements in Performance and Usability. *Biol. Evol.* 30(4):772-780.
- KOROLEVA, O; DAVIES, A; DEEKEN R; THORPE, M; TOMOS, D; HEDRICH, R. 2000. Identification of New Glucosinolate-Rich Cell Type in *Arabidopsis* Flower Stalk. *Plant physiology* 124: 599-608.
- KROYMANN, J; TEXTOR, S; TOKUSHISA, J; FALK, K; BARTRAM S; GERSHENZON, J; MITCHELL-OLDS, T. 2001. A gene controlling variation in *Arabidopsis* glucosinolate composition is part of the methionine chain elongation pathway. *Plant physiology* 127: 1077 - 1088.
- KUCHERNING, J.; BUROW, M.; WITTSTOCK, U. 2012. Evolution of specifier proteins in glucosinolate-containing plants. *BMC Evolutionary Biology*: 12-127.
- Laboratorio de sistemática de plantas vasculares. 2013. Instituto de Ecología y Ciencias Ambientales (En línea). UR. Consultado: 15 oct. 2014. Disponible en: <<http://www.thecompositaehut.com/>>
- LEIVA-REVILLA, J.; GUERRA-CASTAÑÓN, F.; OLCESE-MORI, P.; LOZADA, I.; RUBIO, J.; GONZALES, C.; GONZALES, G. 2014. *Rev. Perú Med. Exp. Salud Pública* 31(4): 683-88.
- LI, G.; AMMERMANN, U.; QUIRÓS, C. 2001. Glucosinolate contents in *Maca (Lepidium peruvianum Chacón)* seeds, sprouts, mature plants and several derived commercial products. *Economic Botany* 55(2): 255-262.
- LIU, S; LIU, Y; YANG, X; TONG, C; EDWARD, D; PARKIN, I; ZHAO, M; MA, J; YU, J; HUANG, S; WANG, X; WANG, J; LU, K; FANG, Z; BANCROFT, I; YANG, T; HU, Q; WANG, X; YUE, Z; LI, H; YANG, L; WU, J; ZHOU, Q; WANG, W; KING, G; PIRES, C; LU, C; WU, Z; SAMPATH, P; WANG, Z; GUO, H; PAN, S; YANG, L; MIN, J; ZHANG, D; JIN, D; LI, W; BELCRAM, H; TU, J; GUAN, M; QI, C; DU, D; LI, J; JIANG, L; BATLEY, J; SHARPE, A; PARK, B. RUPERAO, P; CHENG, F; ESPINOSA, N; HUANG, Y; DONG, C; WANG, L; LI, J; HU, Z; ZHUANG, M; HUANG, Y; HUANG, J; SHI, J; MEI, D; LIU, J; LEE, T; WANG, J; JIN, H; LI, Z; LI, X; ZHANG, J; XIAO, L; ZHOU, Y; LIU, Z; LIU, X; QIN, R; TANG, X; LIU, W; WANG, Y; ZHANG, Y; LEE, J; HEE KIM, H; DENOEUDE, F; XU, X; LIANG, X; HUA, W; WANG, X; WANG, J;

- CHALHOUB, B; PATERSON, A. 2014. The *Brassica oleracea* genome reveals the asymmetrical evolution of polyploid genomes. *Nature communications* 5: 3939.
- LÓPEZ-FANDO, A., GÓMEZ-SERRANILLOS, M., IGLESIAS, I., LOCK, O., UPAMAYTA, U. y CARRETERO, M. 2004. *Lepidium peruvianum* chacon restores homeostasis impaired by restraint stress. *Phytotherapy research* 18(6): 471-474.
 - LIU, T.; ZHANG, X.; YANG, H.; AGERBIRK, N.; QIU, Y.; WANG, H.; SHEN, D.; SONG, J.; LI, X. 2016. Vía de biosíntesis de glucosinolatos aromáticos en *Barbarea vulgaris* y su respuesta a la infestación de *Plutella xylostella*. *Plant Sci.*7:38.
 - MANN M. 1997. Ingeniería del software: un enfoque práctico. México, s.e.
 - MARROUN, S.; MONTAUN, S.; MARQUÉS, S.; LAFITE, P.; COADOU, G.; ROLLIN, P.; JOUSSET, G.; SCHULER, M.; TATIBOUËT, A.; OULYADI, H. y DANIELLOU, R. 2016. UGT74B1 from *Arabidopsis thaliana* as a versatile biocatalyst for the synthesis of desulfoglucosinolates. *Organic & biomolecular chemistry* 14(26):6252-61.
 - MEDINA J., GARZÓN F., TAFURTH P. y BARBOSA J. 2012. Recopilación bioinformática (en línea). Bogotá, CO. Consultado 08 nov. 2014. Disponible en <http://www.marcoregalia.com/STUFF/UDISTRITAL/Bioinformatica/Actividades/Libro%20Clases/Libro%20Bioinformatica.pdf>
 - MEWIS, I., ULRICH, CH. y SCHNITZLER, W. 2002. The role of glucosinolates and their hydrolysis products in oviposition and host-plant finding by cabbage webworm, *Hellula undalis*. *Entomologia experimentalis et applicata* 105: 129-139.
 - MORA-GUTIERREZ, R.; RAMIREZ-RODRIGUEZ, J.; ELIZONDO-CORTÉS, M. 2011. Heurística para solucionar problema de alineamiento múltiple de secuencias. *Revista de matemática* 18(1): 121-136.
 - MORILLO, A.; MORILLO, Y. y TOVAR, Y. 2016. Caracterización molecular de cubios (*Tropaolum tuberosum* Ruiz y Pavon) en el departamento de Boyacá. *Revista de ciencias agrícolas* 33(2): 32-42.
 - MUNT, O., PRÜFER, D. y GRONOVER, C. 2013. A novel C-S lyase from the latex-producing plant *Taraxacum brevicorniculatum* displays alanine

- aminotransferase and L-cystine lyase activity. Journal of plant physiology 170: 33-40.
- NAUR, P.; PETERSEN, B.; MIKKELSEN, M.; BAK, S.; RASMUSSEN, H. OLSEN, C. y HALKIER, B. 2003. CYP83A1 and CYP83B1, two nonredundant cytochrome P450 enzymes metabolizing oximes in the biosynthesis of glucosinates in Arabidopsis. Plant Physiology 133: 63-72.
 - OERLEMANS, K; BARRETT, D; SUADES, C; VERKERK, R; DEKKER, M. 2006. Thermal degradation of glucosinolate in red cabbage. Food chemistry 95: 19 - 29.
 - ORTEGA, O. 2000. Estudio de la diversidad genética de ñu no cultivado (*Tropaeolum* ssp.) en el departamento de Cusco. Tesis ing. Agr. Cusco, Perú, Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco.
 - ORTEGA, O., KLIEBENSTEIN, D., ARBIZU, C., ORTEGA, O y QUIROZ, C. 2006. Glucosinolate Survey of Cultivades and Feral Mashua (*Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pavón) in the Cuzco Region of Peru. Economic Botany 60(2): 000-000.
 - PALLAS, V. 2008. Herramientas biotecnológicas en fitopatología. Madrid, ME. Mundi-prensa Libros. 466p.
 - PINO-FIGUEROA, A.; NGUYEN, D.; MAHER, T. 2010. Neuroprotective effects of *Lepidium meyenii* (Maca). Annals of the New York academy of science 1199: 77-85.
 - PINZON, A. 2006. Introducción a la bioinformática. Practica 2: Alineamiento múltiple e identificación y búsqueda de motivos (en línea). Bogotá, CO. Consultado 15 set. 2015. Disponible en <http://bioinf.ibun.unal.edu.co/documentos/multAlignmentCBIB.pdf>.
 - PINZON, A. 2006. Introducción al diseño “in silico” de primers (en línea). Bogota. CO. Consultado 15 set. 2015. Disponible en <http://bioinf.ibun.unal.edu.co/cbib/estudiantes/1-07/primerDesign.pdf>
 - PIOTROWSKI, M., SCHEMENEWITZ, A., LOPUKHINA, A., MÜLLER, A., JANOWITZ, T., WEILER, E., OECKING, C. 2004. Desulfoglucosinolate Sulfotransferase from *Arabidopsis thaliana* catalyze the final step in the biosynthesis of the glucosinolate core structure. The journal of Biological Chemistry 279 (49): 60717-60726.

- PLEDGIE-TRACY, A., SOBOLEWSKI, M., DAVIDSON, N. 2007. Sulforafane induces cell type - specific apoptosis in human breast cancer cell lines. *Mol Cancer Ther* 6: 1013-1021.
- PONCE D., AGUILAR R., SALAS A. y ROCA W. 2010. Colección, caracterización morfológica y molecular en poblaciones silvestres y cultivadas nativas de maca (*Lepidium* spp.). Primer congreso peruano de mejoramiento genético y biotecnología agrícola: 5-7.
- PROCHASKA, H; SANTAMARIA A; TALALAY, P. 1992. Rapid detection of inducers of enzymes that protect against carcinogens. *Medical Science* 89: 2394-2398.
- QUI, D., GAO, M., LI, G. Y QUIROZ, C. 2009. Comparative sequence analysis for Brassica oleracea with similar sequences in B. rapa and *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Rep.* 28: 649-661.
- QUIROS, C., EPPERSON, A., HU, J. y HOLLE, M. 1996. Physiological studies and determination of chromosome number in maca. *Lepidium meyenii* (Brassicaceae). *Economic Botany* 50(2): 216-223.
- QUISPE APAZA, C. 2012. Caracterización morfológica y molecular de mashua *Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pavon (Tropaeolaceae) procedente de 9 distritos de la región Cusco. Tesis Biólogo. Cusco, Perú. Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco.
- RABASA, A., y SANTAMARÍA, L. 2004. Metodología de programación: principios y aplicaciones. España. Editorial club universitario. 125p.
- RATZKA, A., VOGEL, H., KLIEBENSTEIN, D., MITCHELL-OLDS y KROYMANN, J. 2002. Disarming the mustard oil bomb. *Proc Natl Acad Sci USA* 99(17): 11223-11228.
- REDOVNIKOVIC, I; GLIVETIC, T; DELONGA, K; VORKAPIC-FURAC, J. 2008. Glucosinolate and their potential role in plant. *Periodicum biologorum* 110 (4): 297-309.
- RUBIO, J.; YUCRA, S.; GASCO, M. y GONZALES, G. 2011. Dose-response effect of black maca (*Lepidium meyenii*) in mice with memory impairment induced by ethanol. *Toxicology Mechanisms and Methods* 21(8): 628-634.
- SANCHEZ BECERRO, O. 2014. Algoritmos de programación dinámica para resolver problemas de alineamiento de secuencias. Tesis Master en Ingeniería de computadores. Madrid, España. Universidad Complutense de Madrid.

- SHEN, K; MEYERS, B; ISLAM-FARIDI, N; CHIN, D; STELLY, D; MICHELMORE, R. 1998. Resistnce gene candidates identified by PCR with degenerate oligonucleotide primers map to Clusters of resistance genes in lettuce. *MOMI* 11(8): 815-823.
- SMOLEN G, BENDER J. 2002. Arabidopsis Cytochrome P450 cyp83B1 mutations activate the tryptophan biosynthetic pathway. *Genetics* 100: 323-332.
- SONDERBY, I; GEU-FLORES, F; HALKIER, B. 2010. Biosynthesis of glucosinolates - gene discovery and beyond. *Trends in Plant Science* 15 (5): 1360-1385.
- TAMURA, K.; PETERSON, D.; KUMAR, S. 2011. MEGA5: Molecular evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol.* 28(10): 2731-2739.
- TEXTOR, S.; WILLEM, J.; HAUSE, B.; GERSHENZON, J.; TOKUHISA, J. 2007. MAM3 Catalyzes the formation of all aliphatic glucosinolate chain lengths in Arabidopsis. *Plant Physiology* 144: 60-71.
- TOLEDO J., DEHAL P., JARRIN F., HU, J., HERMANN, M., AL-SHEHBAZ, I. y QUIROZ, C. 1998. Genetic variability of *lepidium meyenii* and other Andean Lepidium Species (Brassicaceae) assessed by Molecular Markers. *Annals of Botany* 82: 523-530.
- UCHIYAMA F.; JIKYO, T.; TAKEDA, R.; OGATA, M. 2014. *Lepidium meyenii* (Maca) enhances the serum levels of luteinising hormone in female rats. *Journal of ethnopharmacology* 151(2): 897-902.
- UNTERGASSER, A.; NIJVEEN, H.; RAO X.; BISSELING, T.; GEURTS, R.; LEUNISSEN, J. 2007. Primer3plus, an enhanced web interface to primer3. *Nucleic Acids Res.* 35: W71-W74.
- VALLE, J.; PUMAROLA, T.; ALZAMORA, L.; VALLE, L. 2014. Antiviral activity of maca (*Lepidium meyenii*) against human influenza virus. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* 7(Suppl. 1): S415-S420.
- VÁSQUEZ, J.; GONZÁLES, J.; PINO, J. 2012. Decrease in spermatic parameters of mice treated with hydroalcoholic extract *Tropaeolum tuberosum* “mashua”. *Rev. peru. Boil.* 19(1): 089-093,

- VO, Q; TRENERRY, C; ROCHFORT, S; WADESON, J; LEYTON, C; HUGHES, A. 2013. Synthesis and anti-inflammatory activity of aromatics glucosinolates. *bioorg. Med. Chem.* 21: 5945-5954.
- WANG, J.; QIU, Y.; WANG, X.; YUE, Z.; YANG, X.; CHEN, X.; ZHANG, X.; SHEN, D.; WANG, H.; SONG, J.; HE, H. y LI, X. 2017. Insights into the species-specific metabolic engineering of glucosinolatos in radish (*Raphanus sativus* L.) based on comparative genomic analysis. *Scientific reports* 7: 16040.
- WATSON, J; BAKER, T; BELL, S; GANN, A; LEVINE, M; y LOSICK, R. 2008. *Biología molecular del gen.* 5ta edicion. Madrid. ES. Editorial medica panamericana. 777p.
- WINDE, I. y WITTSTOCK, U. 2011. Insect herbivore counter adaptations to the plant glucosinolate-myrosinase system. *Phytochemistry* 72: 1566-1575.
- WITTSTOCK, U. y HALKIER, B. 2000. Cytochrome P450 CYP79A2 from *Arabidopsis thaliana* L. Catalyses the conversion of 1-phenylalanine in the biosynthesis of benzylglucosinolate. *The journal of biological chemistry* 275 (19): 14659 - 14666.
- WITTSTOCK, U. y HALKIER, B. 2002. Glucosinolate research in the *Arabidopsis* era. *TRENDS in Plant Science* 7(6).
- YANG, B.; QUI, D.; QUIROS, F. 2010. Variation of five glucosinolate genes in *Brassica rapa* in relation to *Brassica oleracea* and *Arabidopsis thaliana*. *Spanish Journal of Agricultural Research* 8 (3): 662-671.
- YUAN G., WANG X., GUO R. y WANG Q. 2010. Effect of salt stress on phenolic compounds, glucosinolate, myrosinase and antioxidant activity in radish sprouts. *Food Chemistry* 121: 1014-1019
- YUCRA, S., GASCO, M., RUBIO, J., NIETO, J. y GONZALES, GF. 2008. Effect of different fractions from hydroalcoholic extract of Black Maca (*Lepidium meyenii*) on testicular function in adult male rats. *Fertil Steril* 89(5): 1461-7.
- ZANG Y., KIM H., KIM J., LIM M., JIN M., LEE S., KWON S, LEE S., HONG J., PARK T., MUN J., SEOL Y., HONG S. Y PARK B., 2009. Genome-wide identification of glucosinolate synthesis genes in *Brassica rapa*. *FEBS journal* 127: 3559-3574.
- ZAVALETA-MEJIA, M. 2000. Alternativas de manejo de las enfermedades de las plantas. *TERRA* 17(3): 201-207.

- ZENICO ET AL., CICERO, A., VALMORRI, L., MERCURIALI, M. y BERCOVICH, E. 2008. Subjetive effects of *Lepidium meyenii* (maca) extract on well-being and sexual performances in patients with mild erectile dysfunction: a randomised, double-blind clinical trial. *Andrologia* 41: 95-99.

VIII. ANEXOS

ANEXO 1. Secuencia del gen CYP79A2 empleadas en los diferentes alineamientos.

Especie	Nombre del transcrito	Base de datos	Longitud de la zona codificante (pb)
Brassica oleracea var. Capitata	Bol044048	Phytozome	1332
Arabidopsis thaliana	7839382	GenBank	1572
Arabidopsis lyrata subsp. Lyrata	297810636	GenBank	1599
Brassica rapa subsp. Pekinensis	237682413	GenBank	1590
Brassica napus	516282859	GenBank	963
Brassica rapa subsp. Chinensis	EU877074	GenBank	981
Camelina sativa LOC104768722	727639542	GenBank	1599
Capsella rubella hypothetical protein	565463303	GenBank	1584
Eutrema salsugineum hypothetical protein	567170601	GenBank	1497
Tarenaya hassleriana LOC104816511	729351739	GenBank	1611

ANEXO 2. Secuencia del gen CYP83A1 empleadas en los diferentes alineamientos.

Especie	Nombre del transcrito	Base de datos	Longitud de la zona codificante (pb)
Brassica oleracea var. Capitata	Bol040365	Phytozome	1506
Arabidopsis thaliana	186511745	GenBank	1509
Arabidopsis lyrata	297800909	GenBank	1509
Boechnera stricta CO29 locus ²	225695627	GenBank	1734
Brassica rapa subsp. Pekinensis	FJ376049	GenBank	1506
B. rapa subsp. Chinensis cultivar pakchoi	296784830	GenBank	1506
Brassica napus	444289212	GenBank	1506
Eruca vesicaria	529060459	GenBank	1506
Brassica Juncea	514245368	GenBank	1506
Brassica nigra	514245356	GenBank	1503
Camelina sativa	727650273	GenBank	1509
Eutrema salsugineum hypothetical protein	567222457	GenBank	1506
Eruca vesicaria subsp. sativa	529060459	GenBank	1506
Raphanus sativus cultivar ShengFeng	559163150	GenBank	1509
Thelluginella halophila clone: RTFL01-07-N07	312282020	GenBank	1506

² [secuencia del genoma](#)

ANEXO 3. Secuencia del gen CYP83B1 empleadas en los diferentes alineamientos.

Especie	Nombre del transcrito	Base de datos	Longitud de la zona codificante (pb)
Brassica oleracea var. Capitata	Bol033477	Phytozome	1473
Arabidopsis thaliana	30689055	GenBank	1500
Arabidopsis lyrata subsp. Lyrata	297798829	GenBank	1500
Brassica oleracea var. botrytis	GU584125	GenBank	1500
Brassica oleracea var. italica	440573271	GenBank	1260
Brassica rapa subsp. rapa	197090682	GenBank	1500
Brassica rapa subsp. Pekinensis	197090684	GenBank	1500
Brassica rapa subsp. chinensis	FJ372992	GenBank	1500
Brassica napus	444289214	GenBank	1500
Capsella rubella hypothetical protein	565451293	GenBank	1500
Eutrema salsugineum hypothetical protein	567189672	GenBank	1368
Eruca vesicaria subsp. Sativa	529060471	GenBank	1500
Raphanus sativus cultivar ShengFeng	559163148	GenBank	1500
Camelina sativa LOC104730102	727549379	GenBank	1500
Tarenaya hassleriana	729311691	GenBank	1497

² *parcial CDs*

ANEXO 4. Secuencia del gen SUR1 empleadas en los diferentes alineamientos.

Especie	Nombre del transcrito	Base de datos	Longitud de la zona codificante (pb)
Brassica oleracea var. capitata	Bol038767	Phytozome	1209
Arabidopsis thaliana	NM_127622	GenBank	1389
Arabidopsis lyrata subsp. Lyrata	297836819	GenBank	1389
Brassica rapa subsp. Chinensis	197090718	GenBank	1362
B. rapa subsp. rapa cult.tops rapa febrario	197090716	GenBank	1362
B. rapa subsp. Pekinensis cultivar matsushima	197090706	GenBank	1362
B. rapa subsp. rapa cultivar tops rapa 60 giorni	197090714	GenBank	1362
B. rapa subsp. Rapa cultivar white lady	197090710	GenBank	1362
B. rapa subsp. Rapa cultivar yorii spring	197090708	GenBank	1362
B. rapa subsp. Pekinensis	FJ376052	GenBank	1524
B. rapa subsp. Rapa cultivar tokyo top	197090712	GenBank	1362
Eruca vesicaria subsp. Sativa	529060484	GenBank	1377
C. rubella hypothetical protein	565443172	GenBank	1362
E. salsugineum hypothetical protein	567218653	GenBank	1371

ANEXO 5. Secuencia del gen UGT74B1 empleadas en los diferentes alineamientos.

Especie	Nombre del transcrito	Gen	Longitud de la zona codificante (pb)
Brassica oleracea var. capitata	Bol005786	Phytozome	1311
Arabidopsis thaliana	30688723	GenBank	1383
Brassica oleracea var. italica	KP693685	GenBank	1401
Arabidopsis lyrata subsp. Lyrata	297850887	GenBank	1389
Brassica napus	15824450	GenBank	1401
Brassica oleracea var. botrytis	321120953	GenBank	1401
Brassica rapa subsp. Pekinensis	FJ376054	GenBank	1404
Camelina sativa LOC104776536	727435299	GenBank	1389
Tarenaya hassleriana LOC104822956	729392185	GenBank	1386
Capsella rubella hypothetical protein	565499613	GenBank	1389
Eutrema salsugineum hypothetical protein	567148260	GenBank	1392

ANEXO 6. Secuencia del gen ST5a empleadas en los diferentes alineamientos.

Especie	Nombre del transcrito	Gen	Longitud de la zona codificante (pb)
Brassica oleracea var. capitata	Bol039395	Phytozome	1014
Arabidopsis thaliana	30698989	GenBank	1017
Arabidopsis lyrata	297842164	GenBank	1017
Brassica oleracea var. botrytis	321117554	GenBank	1014
Brassica rapa subsp. chinensis	197090698	GenBank	1020
Brassica rapa subsp. Pekinensis cultivar Kwan-Hoo Choi	197090696	GenBank	1020
Brassica rapa subsp. Pekinensis cultivar Matsushima	197090690	GenBank	1020
Brassica rapa subsp. rapa cultivar Tokyo Top	197090694	GenBank	1020
Brassica rapa subsp. rapa cultivar Tops Rapa Febbrario	197090700	GenBank	1020
Brassica rapa subsp. rapa cultivar Yorii Spring	197090722	GenBank	1020
Brassica rapa subsp. rapa cultivar White Lady	197090692	GenBank	1020
Brassica napus	908841012	GenBank	1020
Camelia sativa LOC104713044	727504599	GenBank	1014
Tarenaya hassleriana LOC104812112	XM_010539105	GenBank	1035
Capsella rubella hypothetical protein	565489752	GenBank	1014
Eutrema salsugineum hypothetical protein	567121672	GenBank	1050

ANEXO 7: Soluciones empleadas en la extracción de ADN

Buffer de extracción CTAB 2X

Componentes	Para 100mL
CTAB	2 g
NaCl	8,18 g
EDTA 0.5M	4 ml
PVP	1 g
Tris HCl (1M) pH 8	10 ml

El CTAB y el PVP se agregan en caliente y se autoclava

Buffer TE

Componentes	Para 1000ml
Tris HCl (1M) pH 8	10,0 ml
EDTA (0.5M) pH 8	2,0 ml

Enrazar a 1L de agua destilada y autoclavar

Tris HCL

Componentes	Para 100mL
Tris base	12,11 g
Agua destilada	80 ml

Llevar a pH 8 con HCl concentrado enrazar a 100mL y autoclavar

CTAB 10X

Componentes	Para 100mL
CTAB	5,0 g
NaCl	2,05 g
EDTA (1M) pH 8	5 ml

El CTAB se agrega en caliente. Enrazar y autoclavar.

Cloroformo OH - isoamílico

Componentes	Para 100mL
CTAB	2 g
NaCl	8,18 g
EDTA 0.5M	4 ml
PVP	1 g
Tris HCl (1M) pH 8	10 ml

El CTAB y el PVP se agregan en caliente y se autoclava

ANEXO 8: Soluciones empleadas en la electroforesis

Gel de agarosa al 1%

Componentes	Para 100mL
TBE 1X	100mL
Agarosa	1g

La agarosa se diluye en caliente

TBE 10X

Componentes	Para 1000mL
Tris base	108,0 g
Ácido bórico	55,0 g
EDTA (0.5M) pH 8	40 ml

Marcador de peso λ HindIII

Componentes	Para 1000mL
λ HindIII	1 μ l
Azul de bromofenol	1 μ l
Agua miliQ	4 μ l

Marcador de peso de 100 o 50pb

Componentes	Para 7 μ l
Sal 2.5X	5.9 μ l
Gel red	0.1 μ l
Marcador (100pb o 50pb)	1.0 μ l