

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA

LA MOLINA

FACULTAD DE CIENCIAS



**“ANÁLISIS DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA DE PAPAS NATIVAS
DE LA ZONA SUROESTE DEL DEPARTAMENTO DE JUNÍN
MEDIANTE EL USO DE MARCADORES MOLECULARES
MICROSATÉLITES”**

Presentado por:

LUIS ALFREDO ROCA INFANTE

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE
BIÓLOGO**

Lima - Perú

2015

A Dios,
por brindarme salud, amor y alegría.

A mi madre Ana,
por acompañarme en cada momento de mi vida, por enseñarme a ser un gran profesional
con su ejemplo, por su apoyo y sobre todo por su eterno amor.

A mi padre,
por motivarme siempre a saber más y cultivar en mí metas de vida.

A mis hermanos Vanessa y Jorge,
por su amistad, apoyo y honesto amor.

A Alicia,
por su ser mi soporte, mi alegría y por su amor incondicional.

AGRADECIMIENTOS

A mi alma Mater, la Universidad Nacional Agraria La Molina, por permitirme ser parte de esta generación de triunfadores y gente productiva para el país.

Al Centro Internacional de la Papa (CIP), por acogerme en sus instalaciones y darme la oportunidad de hacer investigación para el Perú.

Al Dr. Stef De Haan, líder del programa de Recursos Genéticos del CIP, por su tutoría, por depositar su confianza en mi trabajo e impulsar mi desarrollo profesional.

A Rosario Herrera, por su tutoría en la ejecución de mi tesis y haberme permitido desarrollar el presente trabajo de investigación. A los técnicos, José Rodríguez, Luciano Fernández y Luis Gutiérrez por enseñarme el trabajo en laboratorio y su ayuda constante a lo largo de la parte experimental de esta investigación. A Juan Daniel Montenegro, por su amistad, ayuda, paciencia y momentos inolvidables en el laboratorio.

A la Dra. Flor Rodríguez, y Jorge Núñez, por sus sabios consejos, interminables asesorías y enseñanzas a lo largo de la redacción de mi tesis.

A mi asesor César López Bonilla y a los miembros del jurado por sus orientaciones en el desarrollo de esta investigación.

A mis amigos, Julio, Mariela, María “chiquita”, María “grande”, Joel, Ronald, Betito y todas aquellas personas que de alguna manera me apoyaron durante la elaboración y culminación de este trabajo de investigación.

Finalmente, pero no menos importante, un especial agradecimiento a los agricultores del Perú, por preservar con su trabajo diario la gran biodiversidad que posee nuestro país.

ÍNDICE GENERAL

I. INTRODUCCIÓN	1
II. OBJETIVOS	4
2.1. OBJETIVO GENERAL	4
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	4
III. REVISIÓN DE LITERATURA	5
3.1 BIODIVERSIDAD	5
3.1.1 IMPORTANCIA DE LA BIODIVERSIDAD	6
3.1.2 NIVELES DE BIODIVERSIDAD	6
3.2 RECURSOS FITOGENÉTICOS	7
3.2.1 CONSERVACIÓN DE LOS RECURSOS FITOGENÉTICOS	9
3.3 MÉTODOS DE CONSERVACIÓN	9
3.3.1 CONSERVACIÓN <i>EX SITU</i>	9
3.3.2 CONSERVACIÓN <i>IN SITU</i>	10
3.4 LA PAPA.....	13
3.4.1 ORIGEN DE LA PAPA	13
3.4.2 CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DE LA PAPA	13
3.4.3 IMPORTANCIA DE LA PAPA	16
3.4.4 EVOLUCIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE LA PAPA.....	17
3.4.5 CONSERVACIÓN DEL CULTIVO DE PAPA	21
3.5 DEPARTAMENTO DE JUNÍN.....	21
3.6 MARCADORES MOLECULARES	23
• Técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (pcr).....	24
3.6.1 TÉCNICAS DE HIBRIDACIÓN O QUE NO SE BASAN EN LA TÉCNICA DE PCR	25
3.6.2 TÉCNICAS BASADAS EN EL PCR	25
a. Técnicas con iniciadores arbitrarios	25
b. Técnicas con iniciadores sitio específicas	27
3.7 MARCADORES MOLECULARES MICROSATÉLITES	28
3.7.1 GENERALIDADES.....	28
3.7.2 USOS DE MICROSATÉLITES EN PAPA	30
3.8 SISTEMA LI-COR.....	31
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	32
4.1 MATERIALES	32
4.1.1 MATERIAL BIOLÓGICO	32
4.1.2 MATERIAL QUÍMICO	35
4.1.3 EQUIPOS	36
4.1.4 MATERIALES DE LABORATORIO.....	37
4.1.5 PROGRAMAS DE CÓMPUTO	38
4.2 MÉTODOS	39

4.2.1 MUESTREO DE MATERIAL BIOLÓGICO.....	39
4.2.2 EXTRACCIÓN DE LOS ÁCIDOS NUCLEICOS	39
4.2.3 EVALUACIÓN DE LA CALIDAD Y CUANTIFICACIÓN DE ADN	39
4.2.4 DILUCIÓN DE ADN.....	40
4.2.5 AMPLIFICACIÓN DE MICROSATÉLITES	40
a. Set de identificación genética de papa.....	40
b. Protocolo de amplificación.....	41
4.2.6 ELECTROFORESIS DE LOS PRODUCTOS AMPLIFICADOS	42
4.2.7 DETECCIÓN, EVALUACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE AMPLICONES	42
4.2.8 OBTENCIÓN DE LA BASE DE DATOS	43
4.2.9 ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS	44
Frecuencia y riqueza alélica	44
b. Determinación de la Heterocigocidad esperada (He)	45
c. Determinación del contenido de información polimórfica.....	46
d. Matriz de disimilitud	46
e. Análisis de agrupamiento	47
f. Análisis de la Variancia Molecular (AMOVA)	48
V. RESULTADOS Y DISCUSIONES	50
5.1 ANÁLISIS EXTRACCIÓN DE ADN, PRUEBAS DE CALIDAD Y CUANTIFICACIÓN	50
5.2 ANALISIS DE MICROSATÉLITES UTILIZADOS	51
5.2.1 MICROSATÉLITES CONSIDERADOS PARA LA EVALUACIÓN DE DIVERSIDAD.....	51
5.2.2 EVALUACIÓN DEL CONTENIDO DE INFORMACIÓN POLIMÓRFICA (PIC) PARA LOS MICROSATÉLITES	53
5.3 CULTIVARES CONSIDERADOS PARA LA EVALUACIÓN DE DIVERSIDAD	54
5.4 RIQUEZA Y FRECUENCIAS ALÉLICAS	55
5.4.1 NÚMERO TOTAL DE ALELOS ENCONTRADOS EN LA COLECCIÓN ...	55
5.4.2 ALELOS ENCONTRADOS	56
5.4.3 CLASIFICACIÓN DE ALELOS POR COMUNIDADES.....	58
5.4.4 ALELOS COMUNES Y ALELOS EXCLUSIVOS	59
5.4.5 ANÁLISIS DE CULTIVARES CON HAPLOTIPOS COMPARTIDOS	60
5.4.6 HETEROCIGOSIDAD ESPERADA.....	62
5.5 ANÁLISIS DE VARIANZA MOLECULAR.....	64
5.6 ANÁLISIS DE AGRUPAMIENTO.....	64
VI. CONCLUSIONES.....	68
VII. RECOMENDACIONES	69
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70

IX. ANEXOS	80
-------------------------	-----------

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Resumen de las teorías taxonómicas más importantes de papa cultivadas	15
Tabla 2. Tabla resumen con rango códigos de los cultivares..	32
Tabla 3. Latitudes, longitudes y altitudes de las comunidades en estudio.	34
Tabla 4. Programa de PCR, tiempos y temperaturas.....	42
Tabla 5. Representación de los componentes que definen un AMOVA.....	49
Tabla 6. Microsatélite utilizados para la caracterización de papas cultivadas	53
Tabla 7. Valores de PIC para comunidades y colección total.	54
Tabla 8. Análisis de la riqueza alélica en las 7 comunidades.....	58
Tabla 9. Número de alelos comunes, exclusivos entre comunidades y número de alelos totales para cada uno de los marcadores microsatélites utilizados.....	60
Tabla 10. Número de haplotipos compartidos de la colección total y comunidades. Información de número de cultivares por comunidad, riqueza alélica y número de haplotipos compartidos.....	62
Tabla 11. Valores corregidos de He para comunidades y colección total.....	63
Tabla 12. Análisis AMOVA para las siete comunidades (Índice de fijación (F_{st})= 0.019).	64

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Composición química del tubérculo de la papa	16
Figura 2. Domesticación y especiación de las papas cultivadas.....	17
Figura 3. Distribución geográfica de las especies <i>S. tuberosum</i> subsp. <i>tuberosum</i> , <i>S. tuberosum</i> subsp. <i>andigena</i> , <i>S. chaucha</i> , <i>S. juzepczukii</i> y <i>S. curtilobum</i>	19
Figura 4. Distribución geográfica de <i>S. stenotomum</i> , <i>S. phureja</i> y <i>S. ajanhuri</i>	20
Figura 5. Mapa político del departamento de Junín.	22
Figura 6. Evolución de los marcadores moleculares desde el año 1966 hasta 2003	28
Figura 7. Ubicación de las comunidades en estudio en Mapa político de Junín	34
Figura 8. Ubicación de las comunidades en estudio sobre el Mapa geográfico de Junín. ..	35
Figura 9. Pruebas de calidad de ADN en agarosa. En la figura se pueden observar algunas de los ADN extraídos en agarosa 1%.....	50
Figura 10. Imágenes de las amplificaciones mostradas en el software Saga Generation....	57
Figura 11. Mapa con las localizaciones de las 7 comunidades evaluadas de la zona suroeste de Junín.....	61
Figura 12. Diagrama de Cajas (Box Plot) de la heterocigosidad total y de comunidades...	63
Figura 13. Dendogramas de la población suroeste de Junín, con diferentes número de cultivares.....	66
Figura 14. Árbol radial de la zona suroeste del departamento de Junín. Dendograma construido con agrupamiento UPGMA.	67

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO I - Características de microsatélites del PGI-Kit	80
ANEXO II - Extracción de ADN	82
ANEXO III - Preparación de diluciones de ADN	84
ANEXO IV - Reacción en cadena de la polimerasa.....	85
ANEXO V - Lista de alelos exclusivos para cada comunidad en cada microsatélite	86
ANEXO VI - Soluciones Stock	87

ABREVIATURAS

ADN	: Ácido desoxiribonucleico
AFLP	: Amplified fragment length polymorphism
AP-PCR	: Arbitrarily primed PCR
CAPS	: Secuencia polimórfica amplificada y cortada
CBD	: Convenio sobre la diversidad Biológica
CIP	: Centro Internacional de la Papa
CTAB	: Bromuro de N,N,N-trimetilhexadecanamonio
DAF	: DNA amplification figerprinting
DARwin	: Dissimilarity Analysis and Representation for Windows
dNTPS	: Deoxinucleotidos trifosfato
EDTA	: Ethylenediaminetetraacetic acid (Ácido etilendiaminotetraacético)
ESA	: European Seed Association
FAO	: Food and agriculture Organization (Organización para la alimentación y agricultura)
FAOSTAT	: Food and Agriculture Organization Statistics Division
INIA	: Instituto Nacional de Innovación Agraria
MINAG	: Ministerio de Agricultura
Msns	: Metros sobre el nivel del mar
NTYSIS	: Numerical Taxonomy system
ONU	: Organización de las Naciones Unidas
PCR	: Polumerase Chain Reaction
PGI	: Potato genetic information (informacion genetica de papa)
PIC	: Polymorphic information coefficient (Coeficiente de información polimórfica)
RAPD	: Random Amplified Polymorphic DNA (amplificación aleatoria de ADN polimórfico)
RIU	: Research Informatics Unit
SNPs	: Polimorfismo de nucleotide simple
STMS	: Sequence-tagged microsatellite sites
TILLING	: Targeting Induced Local Lesions in Genomes
VNTR	: Número variable de repeticiones en tándem

RESUMEN

El departamento de Junín es conocido por ser uno de los lugares con mayor diversidad de papa cultivada en el Perú, sus variados rangos de climas y ecosistemas ha permitido la adaptación y la proliferación de una gran diversidad de papas. Sin embargo esta diversidad no ha sido completamente estudiada en el campo y es necesario investigaciones sistemáticas que permitan estimar la verdadera diversidad existente en el campo y así poder diferenciar está en posteriores años. La caracterización genética utilizando marcadores microsatélites (SSR) se realizó en 444 cultivares de papas nativas de la región sur oeste del departamento de Junín, 7 comunidades de la región fueron estudiadas junto con los agricultores. Se utilizaron 21 pares de iniciadores SSR presentándose 158 bandas polimórficas para toda la población. Se encontraron 32 alelos raros ($f < 1\%$) y 27 escasos ($1\% < f < 5\%$). Así mismo los valores de heterocigocidad se encontraron entre 0.64 y 0.70 siendo el promedio para las comunidades de 0.67. Se encontraron además 14 haplotipos compartidos, siendo la mayoría de estos encontrados dentro de la comunidad de Masmachicche. Los agrupamientos por disimilitud permitieron observar que no existe una agrupación específica por comunidades, siendo la diversidad entre estas distinta y diversas. Esta última observación se corroboró en el análisis AMOVA, que permitió comprender que la diversidad entre las comunidades en base a sus frecuencias alélicas es baja, sin embargo dentro de cada comunidad es alta.

Palabras clave: Biodiversidad, microsatélites, conservación *insitu*, riqueza alélica, Junín.

ABSTRACT

The department of Junín is known for being one of the places that has the major diversity of cultivated potato in Perú, their different climate conditions and ecosystems have allowed the proliferation of a great diversity of cultivated potatoes. However, this diversity has not completely studied *in situ* and it is necessary to do systematic research to understand and estimate accurately it. The genetic characterization using SSR markers was performed in 444 cultivars of native potatoes which were from the Southwest region of Junín and 7 highland communities which were studied in association with the housekeepers. Twenty-three pairs of SSR primers were used and 158 polymorphic allelic bands were found. Thirty-four of alleles were categorized as rare ($f < 1\%$) and thirty-nine as scarce ($1\% < f < 5\%$). Additionally, the proportion of values for heterocigosity to each community was ranged from 0.64 to 0.70 and averaged 0.67. Also, eighteen shared haplotypes were found and approximately the majority of this belonging to Masmachicche community. The tree based on dissimilarity distance showed not specific arrange of branches for the diversity found between and within the highland communities. This was confirmed by AMOVA that found that 98% of the diversity was in the highland communities and only less than 2% among communities.

Key words: Biodiversity, microsatellites, *in situ* conservation, Junín allelic richness.

I. INTRODUCCIÓN

Se espera para futuro el incremento de las condiciones adversas para los cultivos debido al cambio climático, lo cual implica que los agricultores e investigadores necesitarán de herramientas para hacer frente a las dificultades como el acrecentamiento de plagas, enfermedades, sequías, inundaciones, heladas, etc. Es así como el conocimiento y acceso a la diversidad de recursos fitogenéticos es de importancia vital para enfrentar y asegurar la alimentación mundial (FAO, 2010). Es así como la pérdida de diversidad, conocida también como la erosión genética, se pone en peligro nuestra subsistencia, ya que sin esta no tenemos la capacidad para responder a los cambios climáticos y demográficos que vivimos en la actualidad (Baena *et al.*, 2003).

La variabilidad genética está sujeta a las fuerzas evolutivas, y estas a su vez son influenciadas por los cambios bióticos y/o abióticos, es por tal razón que la diversidad se encuentra en constante dinamismo y es importante conservarla a través del tiempo. La conservación de los recursos genéticos es de importancia relevante para mantener la diversidad, y es de tal forma objetivo de múltiples disciplinas como: la ciencia, la política, la economía y la sociología (O'Brien, 1994). Para ello los programas de conservación necesitan realizar trabajos de investigación previos, dirigidos a monitorear la diversidad existente en zonas potencialmente diversas, teniendo como objetivos estimar la diversidad presente en las regiones escogidas, comparar la diversidad entre diferentes regiones de estudio, hacer seguimiento de los cambios que presentan los cultivos frente a los cambios ambientales, entre otros.

La caracterización de cultivos mediante técnicas moleculares nos permiten estimar la diversidad existente y poder comparar ésta con colecciones de un cultivo ya mantenido en bancos de conservación. En la actualidad la diversidad de papa, como varios cultivos a nivel mundial, se encuentra en peligro constante debido a cambios constantes, es por eso que su constante caracterización en zonas todavía no estudiadas se hace inminente. La caracterización sistemática de la agrobiodiversidad permite planificar y crear estrategias que

aseguren supervivencia y sostenibilidad de los cultivos (de Haan, 2009), permitiendo así el equilibrio del ecosistema al cual pertenecen.

La papa es un cultivo ancestral que tuvo su origen hace más de 8000 años en comunidades de cazadores y recolectores de la cordillera de los Andes, que lograron domesticar plantas silvestres de papa alrededor del lago Titicaca, a más de 3800 msnm (FAO, 2009). La expansión de la papa a lo largo de la cordillera andina generó que esta se adapte a diversas condiciones, permitiendo de esta manera la proliferación de su amplia diversidad actual.

La papa ocupa el tercer lugar dentro de los cultivos alimenticios a nivel mundial. (FAOSTAT, 2013). El Perú ocupa el lugar número 23 entre los principales productores de papa del mundo, participando en el 0.7% de la producción mundial, sin embargo es el país con mayor diversidad de papa. Dada su importancia cultural, económica y social es la base de la alimentación y sustento de la población altoandina. Más del 90% del cultivo se siembra en la sierra, entre 2300 a 4100 msnm, siendo las principales zonas de producción Huánuco, Junín y Puno (MINAG, 2003). Lamentablemente no se realiza documentación sistemáticas de la biodiversidad *in situ* de las regiones altoandinas. Por tal motivo urge realizar el seguimiento y caracterización para revalorizar su importancia y mantener su diversidad.

Los estudios de caracterización son muy importantes dentro de los sistemas de conservación, siendo generalmente estas de tipo fenotípica (morfológicas) y/o genotípicas (moleculares). Las caracterizaciones moleculares se han desarrollado rápidamente desde 1980, y han tomado gran fuerza desde entonces principalmente porque no son influenciadas por el medio ambiente y tienen una fuerte base estadística en su análisis. No obstante, los investigadores no deberían elegirlas como sustituto de las caracterizaciones morfológicas (Karp *et al.*, 1997), de esta manera las estructuras genéticas de las poblaciones en estudio deben ser integradas junto con toda la información disponible (datos morfológicos, fisiológicos, bioquímicos, etc.), con el fin de enriquecer la visión de los verdaderos riesgos de desaparición o declive de las poblaciones consideradas, así como las medidas y estrategias más adecuadas en las que se deben basar los programas de conservación (O'Brien, 1994).

Dentro de las técnicas usadas en las caracterizaciones moleculares, encontramos a los microsatélites, estos marcadores son uno de los más utilizados en la actualidad para estudios de diversidad (Karp *et al.*, 1997), ya que ofrece múltiples ventajas como expresión codominante, multialelismo y contenido de información polimórfica (PIC) elevado (Ferreira 1998), entre otras ventajas.

La presente investigación tiene como principal objetivo estimar la diversidad de los cultivares de papa nativa de la zona suroeste del departamento de Junín, utilizando marcadores moleculares microsatélites. Siendo el presente trabajo uno de los primeros en caracterizar los cultivares y evaluar la diversidad *in situ* presente en esta zona de Junín permitirá determinar si es que la diversidad de esta zona que es protegida por los agricultores es de importancia para el cultivo de la papa. Así mismo, permitirá determinar si es importante considerar estos cultivares en programas y estrategias de conservación futuras, sean tanto *ex situ* o *in situ*.

II. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GENERAL

- Estimar la diversidad genética de papas nativas en la región suroeste del Departamento de Junín.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar la estructura genética dentro y entre las comunidades evaluadas (Pomamanta, Racracaya, Masmachicche, Ranra, Quillcas, Marcavalle y Paca Paccha).
- Identificar los cultivares que presentaron haplotipos compartidos entre las comunidades evaluadas.

III. REVISIÓN DE LITERATURA

3.1 BIODIVERSIDAD

El término “biodiversidad” fue utilizado por primera vez por Raymond F. Dasmann, científico y conservacionista, en su libro titulado “*Un tipo diferente de país*” publicado en 1968, en el cual defiende la conservación de los recursos naturales. Sin embargo, el uso común del término en los contextos científicos y ambientales aparece recién a los años 80 (ESA, 2010).

En 1992 se firmó el convenio sobre la diversidad Biológica (CBD) en la Conferencia de las Naciones Unidas sobre el Medio Ambiente y el Desarrollo y entró en vigor el 29 de diciembre de 1993. En el año 2006 “El Convenio sobre la Diversidad Biológica” (CBD) define la diversidad biológica como “*la variabilidad entre organismos vivos de todas las fuentes, incluidos entre otras cosas, los ecosistemas terrestres, marinos y otros ecosistemas acuáticos y los complejos ecológicos de los que forman parte; incluyendo la diversidad dentro de cada especie, entre las especies y de los ecosistemas*”

Es cierto que la diversidad biológica es un concepto muy amplio y es por tal razón que en diversos círculos científicos existen diferentes formas de definir este concepto, sin embargo todas estas concuerdan en que el sentido de que la biodiversidad es un concepto multinivel que abarca no solo la diversidad como una amplia variedad de plantas, animales y microorganismos, sino también como la diversidad genética entre especies y variedades que concurren en los diferentes ecosistemas (ESA, 2010).

3.1.1 IMPORTANCIA DE LA BIODIVERSIDAD

La conservación de los ecosistemas, especies y recursos genéticos asegura su perpetuidad, y de esta forma proporcionara las sostenibilidad y seguridad alimentaria para el ser humano. Debido a que la biodiversidad es inmensa, se deben de focalizar los recursos disponibles para los proyectos de conservación, y realizar los estudios y evaluaciones de especies susceptibles, en peligro y de importancias socioeconómica, como por ejemplo: especies el peligro de extinción, especies endémicas, especies de importancia alimenticia y/o económica, etc. Consecuentemente se deben de tomar medidas para proteger, establecer y/o mantener en equilibrio los hábitats naturales y vitales para especies. Lo cual puede impedir y/o minimizar pérdidas irremplazables de la diversidad.

Los recursos naturales generan beneficios y estos deben manejarse de forma justa y equitativa. La repartición y el cuidado deben tomarse en cuenta en un contexto intergeneracional, es decir, tanto para las generaciones actuales como para las futuras. El capital natural no es un negocio a corto plazo y es participativo, es por tal que su manejo debe ser regulado con igualdad para todas las generaciones y las decisiones para su desarrollo serán elegidas por cada generación (Cuadra, 2012).

El reciente protocolo de Nagoya, firmado el año 2010, ratifica y promueve la participación justa y equitativa de los beneficios que se deriven de la utilización de los recursos genéticos, tanto por medios de acceso a los recursos genéticos y por medio de la transferencia apropiada de tecnologías pertinentes, teniendo en cuenta los derechos sobre dichos recursos y tecnologías y por medio de la financiación adecuada, contribuyendo a la conservación de la biodiversidad y utilización sostenible de los recursos naturales (CBD, 2011).

3.1.2 NIVELES DE BIODIVERSIDAD

Los niveles de la biodiversidad son tres. Los ecosistemas propiamente dichos, son el primer nivel de la biodiversidad, en este nivel se encuentran toda la biodiversidad que comprenden todo ecosistema y la interacciones que tienen las diferentes poblaciones de organismos y los factores ambientales, generando y siendo una de las principales fuentes

de variabilidad genética y cambios evolutivos. El segundo nivel abarca todas las especies, dentro de estas la preocupación por las especies vulnerables y amenazadas son de mayor urgencia en los estudios de diversidad, conservación y restablecimiento; de la misma manera las especies de importancia medicinal o agrícola o de otra importancia económica, social cultural o científica y especies características son objetivo de estudios debido a su importancia para la sostenibilidad del hombre.

Los recursos genéticos son el último nivel de biodiversidad, la CBD (2006) los define como “*todo aquel material genético de origen microbiano, animal o vegetal que contiene unidades de herencia o genes; y que representa un valor real o potencial*”. La pérdida de estos recursos es irreversible, por tal motivo se maximizan los esfuerzos para su cuidado. Primordialmente se realizan estudios sobre recursos genéticos en animales y plantas ya que son de vital importancia para la sostenibilidad y la seguridad alimentaria

Los niveles de la diversidad biológica permanecen en equilibrio en la naturaleza, pero este equilibrio se puede alterar fácilmente cuando factores externos ocasionan pérdidas de especies y/o ecosistemas, alterando la interacción entre estos y produciendo así la pérdida de diversidad (Baena *et al.*, 2003).

3.2 RECURSOS FITOGENÉTICOS

Los recursos fitogenéticos, vienen a ser aquellos genes o material hereditario de origen vegetal. Se considera dentro de este grupo a las variedades cultivadas, tanto las nativas (tradicionales) como comerciales; especies silvestres afines a las cultivadas y materiales obtenidos por mejora genética (Martínez, 1993).

Desde la aparición de la agricultura el hombre empieza un nuevo proceso evolutivo en las plantas que doméstica, esta nueva fuerza selectiva origina nuevas variedades, con características morfológicas y fisiológicas peculiares. Estos cultivos primitivos se expandieron y distribuyeron en diversos ecosistemas, teniendo que adaptarse a diferentes condiciones bióticas y abióticas generaron en los cultivos aún más variabilidad con respecto a sus orígenes, teniendo incluso intercambios genéticos de híbridos con especies silvestres de cada nueva zona donde se adaptaban (Martínez, 1993). Debido a las diversas

prácticas agrícolas y a la distribución en diferentes ecosistemas muchas de las especies comienzan a presentar diferentes características y se incrementa su diversidad, gracias a su capacidad de cambio y adaptación ante diferentes estímulos.

De la misma manera como se incrementó la biodiversidad por el manejo agrícola, el mismo hombre sin medir las consecuencias, introduce a comienzos de los años de 1930, los primeros híbridos producidos por mejoramiento genético, en su afán de conseguir características, como por ejemplo el aumento de rendimientos, uniformidad y adaptación para los sistemas producción y comercialización, creando así variedades mejoradas y generando la dependencia de las mismas (Pistorius, 1997)., marcando de esta manera el inicio de la revolución verde. De esta manera se desplazaron a innumerables variedades nativas, poseedoras de una gran diversidad genética. Este quebrantamiento a la biodiversidad tomó aun mayor fuerza con la nueva era industrial, la unificación de hábitos alimentarios, el consumismo exagerado, la depredación y contaminación del medio ambiente y la explotación excesiva de los recursos naturales, generaron y generan actualmente uno de los mayores peligros que atentan contra la biodiversidad y la variabilidad genética (Martínez, 1993).

La erosión genética es consecuencia de las malas decisiones que se han tomado y toman respecto al manejo de los cultivos, manejos con objetivos principalmente comerciales. La situación es aún más crítica ya que los cultivos afectados cuentan con una pobre diversidad y son vulnerables frente a cambios climáticos (sequias, inundaciones, altas temperaturas, etc.) y/o apariciones de nuevas plagas o enfermedades. La hambruna del siglo XIX, denominada “Hambruna de Irlanda” en el cual murieron al menos 1.5 millones de personas y se desplazaron masivamente otro tanto a Estados Unidos (Fry et al., 1993), es un ejemplo dramático que ilustra el peligro de la uniformidad genética, la débil base genética presentada en Europa en ese momento hizo que el tizón tardío (*Phytophthora infestans*) arrasara con el cultivo de papa. A partir del año 1950 se reconoce esta situación adversa y promueve mediante entidades como la FAO, la conservación de los recursos filogenéticos a nivel mundial, incentivando desde entonces la preocupación y los planes de acción para contrarrestar eventuales desastres que atenten contra la seguridad y sostenibilidad alimentaria en el futuro.

3.2.1 CONSERVACIÓN DE LOS RECURSOS FITOGENÉTICOS

En el año 1996 se firma el primer plan de acción mundial para los recursos fitogenéticos para la alimentación mundial y la agricultura. Este documento ha sido la referencia principal para las actividades nacionales, regionales y mundiales destinadas a la conservación y la utilización sostenible de los recursos fitogenéticos para la alimentación y la agricultura y la distribución equitativa y justa de los beneficios derivados de su uso (FAO, 2012). El segundo informe sobre el “*Estado de los Recursos Fitogenéticos para la Alimentación y la Agricultura en el Mundo*”, firmado en el año 2011, ha proporcionado una base sólida y ha servido de orientación para este el proceso de actualización, exigiendo así que se preste más atención a la conservación y utilización de los recursos fitogenéticos para enfrentar los cambios adversos que afectan contra estos en búsqueda de minimizar la erosión genética.

3.3 MÉTODOS DE CONSERVACIÓN

Los bancos genéticos tienen como objetivos la colección, clasificación, conservación, evaluación y distribución los recursos genéticos. Mediante la conservación se cuida y se protegen los recursos naturales, manteniendo a las especies vivas y sin daños en el tiempo. Para esta importante tarea los bancos genéticos han desarrollado dos métodos conservación: La conservación *ex situ* y la conservación *in situ* (Karp *et al.*, 1997).

3.3.1 CONSERVACIÓN *EX SITU*

Se entiende por conservación *ex situ*, al mantenimiento de las especies fuera de su hábitat natural, conservando de esta manera el material genético dentro de instalaciones especializadas, conocidos como los bancos genéticos. Estos son mantenidos por instituciones públicas o privadas actuando independientemente o en conexión con otras instituciones. Los bancos genéticos además de tener dentro de una de sus principales funciones la conservación, también se encargan de la ubicación, colección, caracterización y usos de los recursos genéticos (Upadhayaya *et al.*, 2008).

El objetivo de la conservación *ex situ* es el de mantener las accesiones sin cambios en su constitución genética (Karp *et al.*, 1997), la conservación en sí, no se limita a la consecución y posesión física de los materiales sino también requieren asegurar y establecer sus características originales (Seguel, 2001). Se han creado variadas técnicas para lograr este objetivo, estas dependerán del tipo de cultivo y de los objetivos de la conservación.

Los recursos genéticos se mantienen principalmente dentro de los bancos genéticos en forma de semilla, sembradas en campo, *in vitro* u otros métodos (Seguel, 2001; FAO 2010). Las semillas se mantienen conservadas en almacenes fríos diseñados con características y condiciones tales que logren mantener a las semillas en un estado reposo, también se pueden mantener a las plantas vivas creciendo en campos con condiciones controladas, este método se usa para plantas de propagación vegetativa y cultivos recalcitrantes. En algunos casos, se tienen muestras de tejidos *in vitro* o en criopreservación y unas pocas especies también se mantienen en forma de polen o embriones. Este conjunto de técnicas como ya se mencionó se utilizan para mantener la integridad de las accesiones. Sin embargo a pesar de todos los cuidados y controles la estabilidad de las accesiones en el tiempo no se logra en su totalidad (Del Rio *et al.*, 1997; de Haan *et al.*, 2013).

La conservación *ex situ* presenta una ventaja frente a la conservación *in situ* al momento de conservar los genotipos específicos, pero pierde fuerza al momento de evaluar como estos genotipos reaccionan y cambian evolutivamente en el tiempo como consecuencia de los distintos cambios ambientales y el intercambio genético dentro de una especie.

3.3.2 CONSERVACIÓN *IN SITU*

El convenio sobre la Diversidad Biológica (ONU, 1992), define a la conservación *in situ* como la conservación de los ecosistemas y los hábitats naturales; al mantenimiento y recuperación de poblaciones viables de especies en sus entornos naturales; y en el caso de las especies domesticadas y cultivadas, en los entornos donde hayan desarrollado sus propiedades específicas.

El movimiento a favor de la conservación *in situ* de los recursos genéticos de especies cultivadas surge de una controversia acerca de dónde conservar mejor y de una manera práctica la agrobiodiversidad, no sólo para mantenerla sino para tener acceso a ella tanto para cultivo, como para fitomejoramiento. Esta controversia duró varios años y giró alrededor de las ventajas y desventajas de conservar *ex situ* (Baena *et al.*, 2003).

En la década de los 80 dos fuertes argumentos defendían un nuevo método de conservación frente a la conservación *ex situ*. Uno de ellos resaltaba que las especies cultivadas menores y parientes silvestres no estaban suficientemente representadas en las colecciones de bancos, debido a que las colectas habían sido insuficientes y/o se habían realizado bajo muestreos inadecuados. El otro argumento fundamentaba que los materiales conservados *ex situ* carecían de procesos de evolución, puesto que se los retiraba de su contexto influenciado por el ambiente y las fuerzas evolutivas (Baena *et al.*, 2003).

Brush (1991) afirma que la conservación *in situ* debe de mantener un sistema agrícola que genere diversidad cultivada de manera parecida a un agroecosistema y no dedicarse exclusivamente a conservar un número de alelos. Posteriormente Arora y Paroda (1991), citados por Baena *et al.* (2003), y FAO (1996) apoyan la conservación *in situ* de especies cultivadas, afirmando que esta permite mantener y mejorar los cultivares locales en los sistemas agrícolas tradicionales, y utilizarlos mediante métodos participativos con los agricultores. La mayor parte de la agrobiodiversidad del mundo se encuentra bajo el manejo de los agricultores que siguen prácticas ancestrales (manejo frente a resistencia y/o enfermedades, conocimiento de nombres vernaculares, sistemas de clasificación local de los cultivares, etc.), heredadas por largas generaciones, lo cual incluye factores importantes que son insostenibles en la conservación *ex situ*. Es así que las especies cultivadas son conservadas en sistemas tradicionales de cultivo, zonas modificadas por el hombre para la producción, como comunidades, fincas, huertos, parcelas, etc.

Las amenazas más frecuentes de la conservación *in situ* son la urbanización, la contaminación, la aculturación de las comunidades, y la introducción de variedades mejoradas que desplazan a las tradicionales, reduciendo la diversidad de cultivos (Baena *et al.*, 2003). Sin embargo, frente a estas amenazas Brush (1991), plantea que hay que estimular al agricultor para que continúe sembrando sus variedades y crear condiciones para que los agricultores cooperen entre sí y con los conservacionistas. Explica de esta

manera que la conservación en fincas se debe basar en cuatro principios: mínima intervención institucional, continuidad, objetivo de desarrollo y cooperación.

Si bien muchos de los agricultores no son conscientes de que sus prácticas favorecen la conservación del hábitat y de los recursos fitogenéticos, casi siempre están interesados en diversificar y tener un mayor número de variantes debido a su cosmovisión y conocimientos ancestrales. La diversidad que preservan los agricultores ayuda a reducir los riesgos frente a plagas y enfermedades y controlar las malezas, ampliando de esta manera la variabilidad genética y generando estabilidad a la producción ya que limitan el uso de tecnologías y utilizan eficientemente la mano de obra con recursos limitados. Los sistemas tradicionales son un ejemplo de agricultura ya que manejan de manera eficiente y cuidadosa las interacciones entre los factores bióticos y abióticos, generando así el equilibrio de los ecosistemas y *per se* del cultivo.

Las decisiones del agricultor determinarán la diversidad de su campo, por ejemplo, la selección continua del agricultor por plantas con características agromorfológicas que se ajusten a su preferencia modificarán la estructura genética de las poblaciones en el tiempo. Así mismo, el tamaño y estructura de su población varían dependiendo de la cantidad de semilla que el agricultor decida almacenar y el porcentaje que seleccionará para el intercambio con otros agricultores. Estas decisiones siguen siendo afectadas por el contexto cultural, socioeconómico y en ahora por el creciente cambio climático.

Las anteriores características hacen que los sistemas tradicionales de cultivo jueguen un papel importante en la producción de alimentos, se estima que aun producen 15-20% del alimento en el mundo (Francis 1985), en la conservación de la biodiversidad y representan fuentes de variabilidad para el mejoramiento de los cultivos, con características llamativas y únicas para los mejoradores.

¿Por qué debemos conservar *ex situ* o *in situ*? ¿Qué y cuáles regiones son importantes y debemos conservar? Para responder a estas preguntas es necesario hacer estudios preliminares base, que puedan demostrar la necesidad de imponer un proceso sistemático de conservación. O en el caso contrario predecir que los lugares no son necesarios incluir en proyectos y estrategias de conservación, debido a que su diversidad no difiere de otras regiones o su diversidad es muy pobre.

3.4 LA PAPA

3.4.1 ORIGEN DE LA PAPA

El lugar de origen de las papas cultivadas se encuentra en el área alrededor del lago Titicaca, en las fronteras del Perú y Bolivia (Vreugdenhil *et al.*, 2007). Las papas fueron domesticadas en los Andes del sur de Perú hace unos 10 000 años. *Solanum tuberosum* se domestico de las especies silvestres pertenecientes al complejo *S.brevicaule* (Ovchinnilova *et al.*, 2011). Este complejo es un grupo morfológicamente variable de especies diploides, dentro de este encontramos cerca de 20 especies. Ugent (1966) sugiere que estos pueden ser drásticamente reducibles a una sola especie, *Solanum brevicaule*.

3.4.2 CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DE LA PAPA

La taxonomía de las papas cultivadas y sus parientes silvestres ha sido tema de estudio por muchos años. La mayoría de estos estudios se basaron en la morfología y métodos experimentales como citogenética e hibridación (Vreugdenhil *et al.*, 2007). La taxonomía de la sección Petota es complicada debido a las diferentes características mecanismos de reproducción que poseen y han sufrido respectivamente, como son: la introgresión, la hibridación interespecífica, la autoploidia, la alopoliploidía, la compatibilidad sexual entre muchas especies, la mezcla de la reproducción sexual y asexual, la divergencia de especies, la plasticidad fenotípica y la consiguiente gran similitud morfológica entre las especies (Ovchinnilova *et al.*, 2011).

En 1990, Hawkes en su tratado “La papa: evolución, biodiversidad y recursos genéticos” describió 7 especies cultivadas de papa (*Solanum ajanhuiri*, *S. chaucha*, *S. curtilobum*, *S. juzepczukii*, *S. phureja*, *S. strenotomun* y *S. tuberosum*), dividiendo además en 2 subespecies a la especie *S. tuberosum* (*S. tuberosum tuberosum* y *S. tuberosum andigena*) mostrando diferentes niveles de ploidía. Este tratado ha servido de referencia y punto de partida tanto para el banco de germoplasma del Centro Internacional de la Papa (CIP) como para el banco genético de papa de los Estados Unidos (NRSP-6), a partir del cual surgieron diferentes hipótesis y clasificaciones taxonómicas (Huamán y Spooner, 2002).

Varios autores como Bukasov (1971), Lechnovich (1971), y Ochoa (1990) clasifican a las papas como especies distintas bajo la nomenclatura internacional del código botánico (ICBN), fortaleciendo el enfoque de Hawkes. Sin embargo Dodds (1962), trata a las papas cultivadas bajo el código de nomenclatura de plantas cultivadas (ICNCP). De esta manera los clasifica en grupos cultivares, siendo éstas definidas como categorías taxonómicas usadas para asociar plantas cultivadas con rasgos que son de uso de los agricultores. La clasificación de los grupos cultivares realizada por Dodds (1962) se basó en la comparación morfológica, biología reproductiva, datos citológicos y genéticos, y prácticas culturales. El afirma que los caracteres morfológicos usados por Hawkes (1956) para separar las especies, exageraban la consistencia de los caracteres cualitativos y cuantitativos.

Huaman y Spooner (2002) sugieren una clasificación de 8 grupos (Ajanhuiri, Juzepczukii, Curtilobum, Chilotanum, Andigena, Chaucha, Phureja y Stenotomun), en base a la nomenclatura de ICNCP y las hipótesis de Dodds (1962). La taxonomía utilizada y reconocida actualmente en el CIP es la de Ochoa (1999), la cual adiciona a la especie cultivada *S. goniocalix*, a la clasificación original de Hawkes (1990).

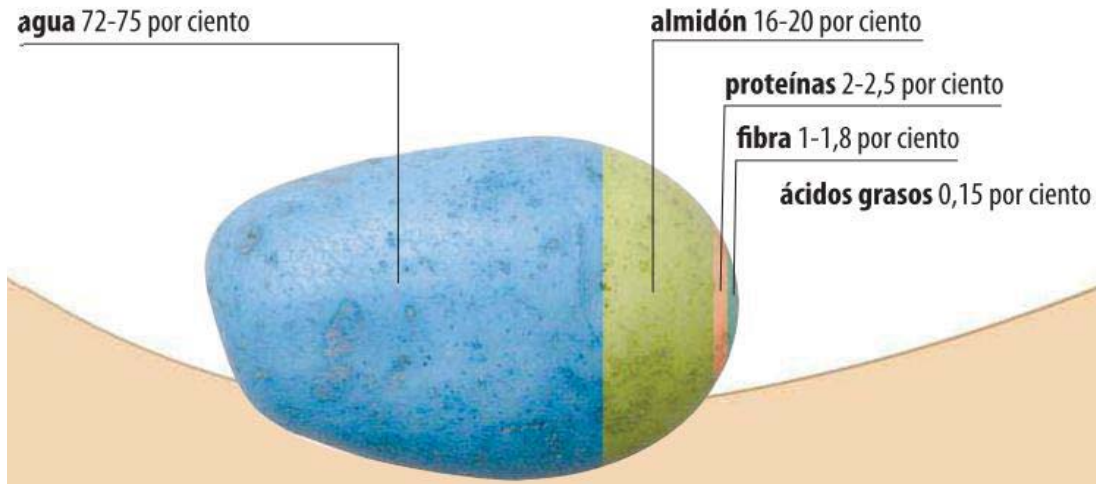
Los niveles de ploidía en papa cultivada, comprenden diploides, triploides, tetraploides y pentaploides (Spooner y Hijmans, 2001). El resumen de las clasificaciones sugeridas para papa cultivada de mayor aceptación se puede observar en la Tabla 1.

Tabla 1. Resumen de las teorías taxonómicas más importantes de papa cultivadas
(de Haan, 2009).

Ploidia	Hawkes (1990)	Ochoa (1999)	Huaman & Spooner (2002)	Spooner <i>et al.</i> (2007)
2n=2x=24	<i>S. phureja</i>	<i>S. phureja</i>	<i>S. tuberosum</i> Grupo Phureja	<i>S. tuberosum</i> diploide Grupo Andigenum
	<i>S. stenotomun</i>	<i>S. stenotomun</i>	<i>S. tuberosum</i> Grupo Stenotomun	<i>S. tuberosum</i> diploide Grupo Andigenum
	<i>S. stenotomun</i>	<i>S. goniocalix</i>	<i>S. tuberosum</i> Grupo Stenotomun	<i>S. tuberosum</i> diploide Grupo Andigenum
	<i>S. ajanhuiri</i>	<i>S. ajanhuiri</i>	<i>S. tuberosum</i> Grupo Ajanhuiri	<i>S. ajanhuiri</i>
2n=3x=36	<i>S. chaucha</i>	<i>S. chaucha</i>	<i>S. tuberosum</i> Grupo Chaucha	<i>S. tuberosum</i> triploide Grupo Andigenum
	<i>S. juzepczukii</i>	<i>S. juzepczukii</i>	<i>S. tuberosum</i> Grupo Juzepczukii	<i>S. juzepczukii</i>
2n=4x=48	<i>S. tuberosum</i> subsp. <i>.andigena</i>	<i>S. tuberosum</i> subsp. <i>.andigena</i>	<i>S. tuberosum</i> Grupo Andigenum	<i>S. tuberosum</i> tetraploide Grupo Andigenum
	<i>S. tuberosum</i> subsp. <i>tuberosum</i>	<i>S. tuberosum</i> subsp. <i>tuberosum</i>	<i>S. tuberosum</i> Grupo Chilotanum	<i>S. tuberosum</i> tetraploide Grupo Chilotanum
2n=5x=60	<i>S. curtilobum</i>	<i>S. curtilobum</i>	Grupo Curtilobum	<i>S. curtilobum</i>

3.4.3 IMPORTANCIA DE LA PAPA

La papa ocupa el tercer lugar mundial en importancia alimenticia, superando al maíz, el trigo (FAOSTAT, 2013). Es una herbácea, tuberosa, perenne de tallo erecto y semi-decumbente que puede alcanzar hasta un metro de altura. La papa produce tubérculos los cuales son alimentos nutritivos, que contienen significativos contenidos de carbohidratos, aminoácidos y vitaminas importantes para la dieta humana (FAO, 2009). La especie es



altamente heterocigota, y en gran medida se reproduce vegetativamente.

Figura 1. Composición química del tubérculo de la papa (FAO, 2009).

Las actuales actividades de mejoramiento de papa están destinadas a desarrollar nuevas variedades de alto rendimiento con resistencia a plagas y enfermedades, al mismo tiempo, el cumplimiento de los requisitos de calidad cada vez mayores de los consumidores y la industria de procesamiento de papa. La mayor parte de las características previstas para la mejora son los rasgos cuantitativos para el que la variación fenotípica depende tanto de factores genéticos y ambientales. La base molecular de muchos de estos rasgos es, sin embargo, poco conocida (Uitdewilligen, 2012).

3.4.4 EVOLUCIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE LA PAPA

La presencia de diploides en especies silvestres y cultivadas sugiere que la evolución de estas especies se ha dado desde las diploides hasta las pentaploides, siendo estas las más recientes y las especies diploides las más primitivas (Vásquez, 1988).

Una de las principales preferencias al momento de domesticar papa fue la disminución de los estolones, presente en las papas silvestres (Hijmans *et al.*, 2002), lo que favorecía la concentración de los tubérculos al pie del tallo y por lo tanto un menor tiempo en su substracción y cosecha. En cuanto a la forma y color de los tubérculos los agricultores andinos mantuvieron una mayor variedad en las especies cultivadas respecto a las especies silvestres (Smartt y Simmonds, 1995). Se buscaron, así mismo, siempre variedades con resistencias a factores abióticos, tubérculos de alta producción, precocidad, buen tamaño y sabor, siendo todas estas características compartidas para todas las papas cultivadas, a pesar del gran polimorfismo que existen entre ellas (Matsubayashi, 1991).

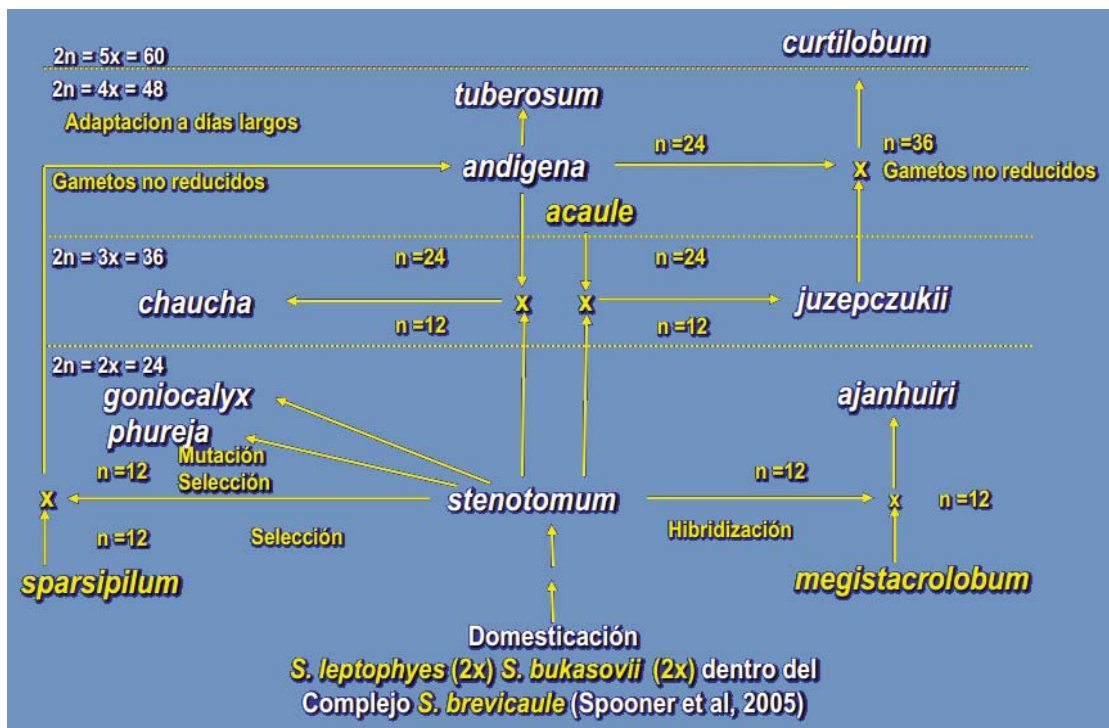


Figura 2. Domesticación y especiación de las papas cultivadas. (Fuente: William Roca, diagrama basado en las teorías de Hawkes (1990) & Salaman (1937))

La dinámica evolutiva de la papa, según Hawkes (1994), se inició con la especie diploide *S. Stenotomun*, considerada la más primitiva de todas las especies cultivadas (ver figura 2),

debido a que sus características se asemejan a las papas silvestres. La hibridación natural de *S. Stenotomun* con la especie silvestre *S. Sparsipilum* seguida de una duplicación cromosómica habría dado origen a la especie tetraploide *S. tuberosum* subsp. *andigena* en los Andes centrales (Crib y Hawkes, 1986). Esta subespecie fue llevada y domesticada al sur de Chile, donde se adaptó a días largos, evolucionando y probablemente originando a *S. tuberosum* subsp. *tuberosum* por procesos de hibridación de *S. tuberosum* subsp. *andigena* con una especie silvestre boliviana o argentina (Hawkes, 1990).

La especie *S. goniocalix* se originó por procesos de mutación de *S. stenotomun* y presenta en la actualidad una gran diversidad que ocupa regiones desde el Norte del Perú hasta el centro de Bolivia. *S. phureja* por otro lado surgió por procesos de selección artificial a partir de *S. stenotomum*, esta especie se caracteriza por tener ciclos de dormancia muy cortos y tener un rápido desarrollo de los tubérculos, estas importantes cualidades permiten a los agricultores a tener hasta tres cosechas al año en las zonas bajas y cálidas de los andes, se distribuye a partir de los Andes de Venezuela hasta la zona central de Bolivia.

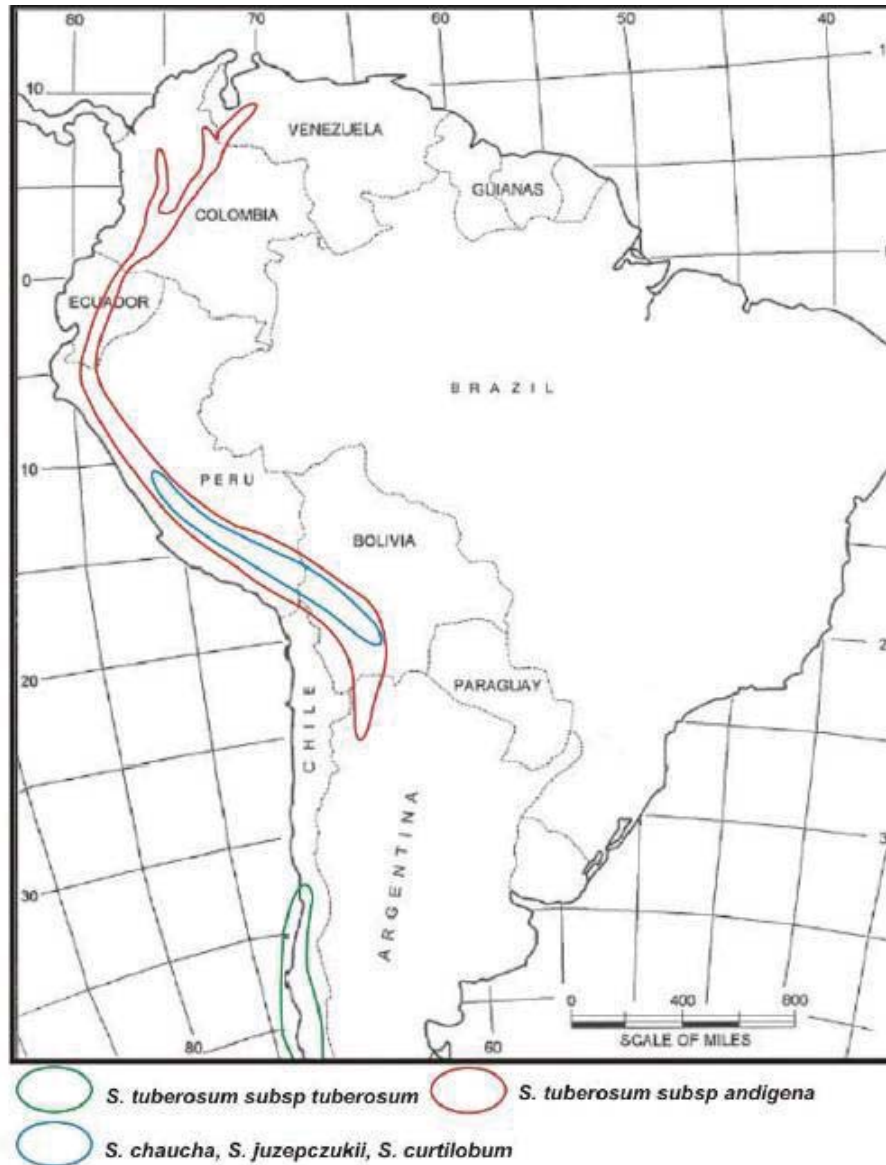


Figura 3. Distribución geográfica de las especies *S. tuberosum* subsp. *tuberosum*, *S. tuberosum* subsp. *andigena*, *S. chaucha*, *S. juzepczukii* y *S. curtilobum*. (Fuente: Hawkes, 1990)

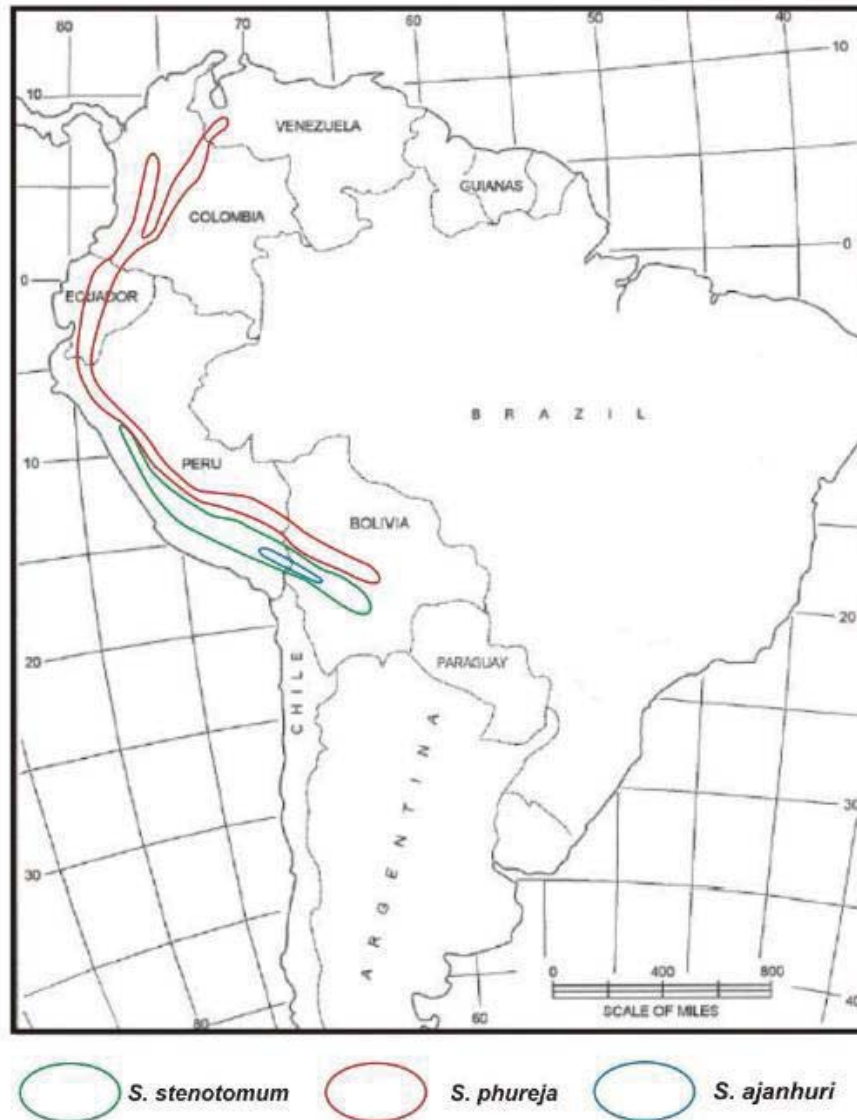


Figura 4. Distribución geográfica de *S. stenotomum*, *S. phureja* y *S. ajanhuri*. (Fuente: Hawkes, 1990)

S. stenotomun dio origen además a 3 especies más por procesos de hibridación: *S. ajahuiri* (hibridación con *S. megistacrolobum*), *S. Juzepczukii* (hibridación con *S. acaule*) y *S. chaucha* (hibridación con *Solanum tuberosum* subsp. *andigena*). *S. ajahuiri* se caracteriza por ser una papa amarga sembrada a los alrededores de lago Titicaca (Huaman *et al.*, 1982). *S. Juzepczukii* por su parte se caracteriza por ser una especie triploide resistente a heladas, abarcando territorios desde la zona sur del Perú al centro de Bolivia (Figura 3). Otro de los híbridos triploides es la especie *S. chaucha*. Los híbridos triploides abarcan grandes territorios desde los Andes centrales del Perú hasta el centro de Bolivia.

La hibridación de *S. juzepczuki* con *S. tuberosum* subsp. *andigena* dio origen a una nueva especie pentaploide de papa cultivada, *S. curtilobum*, especie que conforma una de las dos papas amargas de las zonas altoandinas junto con *S. juzepczukii* (de Haan *et al.*, 2010).

3.4.5 CONSERVACIÓN DEL CULTIVO DE PAPA

Para la papa se están utilizando las dos metodologías de conservación, tanto *ex situ* como *in situ*. Sin embargo esta última recién se está poniendo en práctica en la última década, los recursos genéticos de papa de mayor estudio se encuentran conservados de manera *ex situ*.

Siendo la papa perteneciente a las especies de propagación clonal, en la conservación *ex situ* se utiliza principalmente la conservación en campo, *in vitro* u otras técnicas para el cuidado de este cultivo. Sin embargo, la conservación en campo implica muchas desventajas, como el requerimiento de espacio y la necesidad constante de mano de obra, control de plagas y enfermedades, desastres naturales y pérdida de integridad genética. Pese a estas desventajas sigue siendo una de las alternativas de principal uso, ya que facilita la distribución del material (FAO, 2010).

La conservación *in situ* de la papa ha recobrado fuerzas en la última década, generándose diversos estudios con participación de los agricultores (de Haan, 2009; de haan *et al.*, 2010; Del Rio *et al.*, 1997). Lamentablemente los estudios realizados hasta el momento son muy pocos, siendo un área con gran potencial para investigación a lo largo de todo el Perú, la búsqueda de zonas con gran diversidad es inminente para entender mejor las relaciones inherentes que existen en los agroecosistemas.

3.5 DEPARTAMENTO DE JUNÍN

El departamento de Junín se encuentra ubicado en la parte central de Perú, su clima (valles y quebradas en un promedio de 3500 msnm) es templado y seco, con marcadas diferencias de temperatura durante el día (de 5 a 25 grados Celsius). El departamento ostenta varios pisos ecológicos, teniendo en su sierra baja (yungas y quechuas) y en la sierra alta (suní, punas y cordilleras). Por otro lado la zona de selva posee un clima tropical. Junín fue

creado el 13 de setiembre de 1825 y se encuentra dividido políticamente por 9 provincias: Huancayo (capital), Chupaca, Junín, Tarma, Yauli, Jauja, Chanchamayo, Satipo y Concepción (Figura 1).

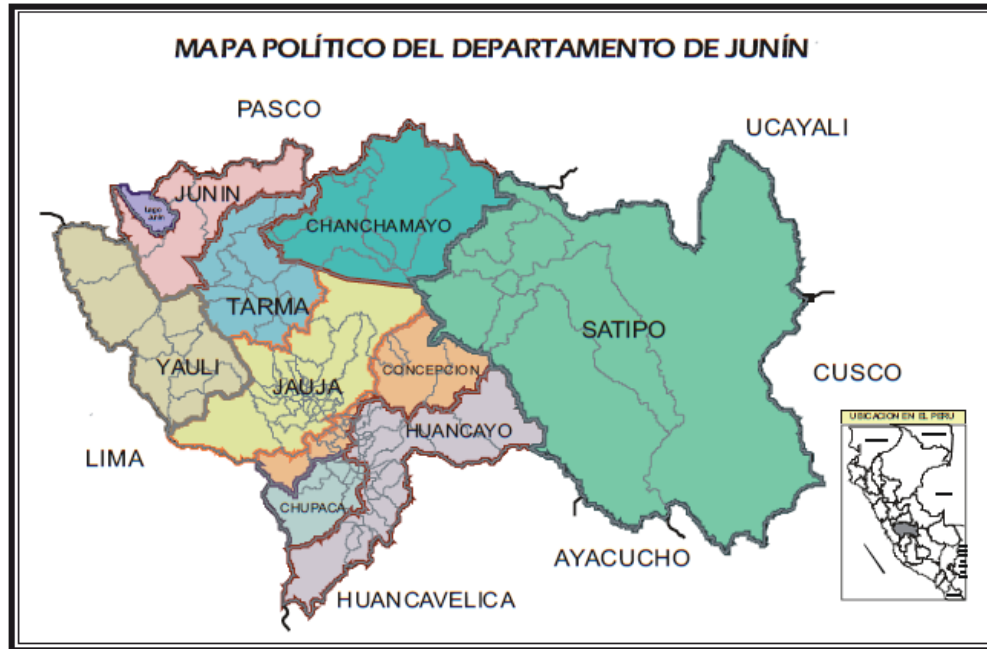


Figura 5. Mapa político del departamento de Junín.

En todos los aspectos referentes a la diversidad biológica, la región Junín posee diversidad ecológica de climas, pisos ecológicos y zonas de producción, y de ecosistemas productivos. En la región Junín, sus diferentes altitudes y climas, generan condiciones excepcionales para el desarrollo de diversos cultivos. Facilita que prospere una amplia gama de productos agrícolas, muchos aún nativos; asimismo, es propicio para una gran diversidad de especies en la flora y fauna. La agricultura regional, en importante porcentaje, depende de los recursos genéticos nativos, como las papas, el maíz, los frijoles, los frutales (naranja, piña, palta, papaya, tuna, camu camu, anona, aguaje, etc.).

El departamento de Junín cuenta con 44, 197 23 Km² de superficie, siendo su densidad poblacional registrada de 27.7 Hab/Km², en el año 2007 es. La tasa poblacional registro un incremento de 1.1% (INEI, 2011).

El clima dentro del departamento de Junín varía de acuerdo con la altitud. En los valles interandinos (mayoritariamente en las provincias de Junín, Yauli, Tarma, Jauja,

Concepción, Chupaca y Huancayo) el clima es templado y frío, con poca presencia de humedad (seco). Mientras que en la zona de ceja de selva y selva (provincias de Chanchamayo y Satipo) el clima es cálido y húmedo, con abundantes lluvias de noviembre a mayo.

La papa constituye el principal cultivo de la zona sierra. Con 23, 168 hectáreas cosechadas durante el 2011 se consolidó como el tercer productor nacional con 4, 169 mil toneladas producidas (10.2 por ciento del total nacional), después de Puno y Huánuco (INEI 2011). No obstante, debido a su ubicación geográfica, Junín y Huánuco se constituyen en los principales ofertantes de papa al mercado limeño, principalmente durante el primer trimestre del año.

3.6 MARCADORES MOLECULARES

En genética, un marcador molecular es un segmento de ADN diferenciado cuyo patrón se transmite de generación en generación y se puede detectar mediante diversas técnicas, es así como cualquier diferencia en la secuencia de ADN entre dos o más individuos pueden servir de marcador genético (Hartl y Jones, 2009). Un marcador debe fundamentalmente ser selectivo neutralmente, es decir, no estar influenciado por el medio ambiente (siendo esta característica una de sus principales ventajas frente a otros marcadores), así mismo debe de seguir las leyes mendelianas de herencia para poder ser usados como herramientas para detectar patrones taxonómicos, de diversidad y demográficos (Selkoe y Toonen, 2006).

La manifestación de múltiples alelos presentes en cada gen, genera la variación genética, esta diversidad se presenta en la mayoría de poblaciones naturales. A estos múltiples estados que puede poseer un gen se le conoce como polimorfismos, los marcadores moleculares que se seleccionarán para una determinada especie o población deben de ser capaces de detectar el mayor número de dichas variaciones. Existen diferentes técnicas moleculares para la búsqueda de estas variaciones, sin embargo no existe un método o técnica ideal, ya que cada una puede representar múltiples ventajas como sus limitaciones. La técnica será elegida principalmente dependiendo de los objetivos del estudio, los costos y de la vigencia de la técnica (Hartl y Jones, 2009).

Según Spooner et al. 2005, podemos definir 2 categorías básicas de marcadores moleculares, los basados en la técnica de PCR y los que no. Sin embargo en la actualidad la colección de marcadores moleculares se ha incrementado potencialmente, a pesar de que muchos de estos se basan en la técnica de PCR, los procesos de automatización modernos requieren el conocimiento de las secuencias y por lo tanto técnicas de secuenciación modernas. Entre algunos de estos marcadores encontramos a los SNPs, teniendo técnicas como SBP (Sahu *et al.*, 2012) o GBS (Elshire *et al.*, 2011). Para el entendimiento de estas técnicas es necesario entender la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa que se presentara a continuación

- **Técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (pcr)**

En el año de 1993 Kary B. Mullis, recibió el Premio Nobel al inventar el método de la reacción en cadena de la polimerasa, método con el cual se pudo obtener grandes cantidades de ADN amplificado selectivamente (Hartl y Jones, 2009). El método permite multiplicar la cantidad de ADN inicial, tras etapas y ciclos de repetición, el detalle de la técnica se puede encontrar en el ANEXO IV.

La principal limitación de la técnica se debe a que las secuencias de los extremos que flanquean la región deben de ser conocidos para sintetizar el par de iniciadores, sin embargo, en los últimos años debido al fuerte incremento de técnicas de secuenciación, el reconocimiento de estas secuencias ya no es una gran limitante.

La técnica de PCR estímulo al menos 3 grandes avances en el estudio molecular (Avisé, 2004): el desarrollo avanzado de iniciadores específicos de amplificación, que permitía el rápido secuenciamiento de fragmentos de ADN y abrían la puertas a grandes contenidos de información filogenética, disponibles en la actualidad; se introdujo el uso de marcadores microsatélites, que superaban por mucho los niveles de heterocigosis de otras técnicas moleculares usadas hasta el momento y el número de alelos por locus; y por último, que se podían amplificar secuencias de ADN desde minúsculas cantidades de ADN de un tejido, reduciendo de esta manera los precios y tiempo en métodos de extracción complicados.

3.6.1 TÉCNICAS DE HIBRIDACIÓN O QUE NO SE BASAN EN LA TÉCNICA DE PCR

En esta categoría encontramos a los marcadores RFLP (Polimorfismos largos de fragmentos por restricción), mediante esta técnica se digiere el ADN por acción de enzimas de restricción y se obtienen fragmentos de restricción polimórficos, estos son separados por electroforesis y revelados luego por hibridación mediante la técnica de Southern Blot (técnica molecular donde se realiza una hibridación de la sonda radioactiva). Dentro de esta categoría también se encuentran los marcadores minisatélites.

A pesar de ser altamente reproducibles y presentar codominancia como importantes ventajas, estos marcadores dejaron de utilizarse debido a múltiples desventajas, tales como el carecer de una buena cantidad de enzimas de restricción necesarios para detectar polimorfismos; no ser posible el uso de enzimas para especies relacionadas taxonómicamente, lo cual aumentaba los costes y tiempos de trabajo al comenzar los estudios para cada organismo; ser difíciles de automatizar; y además necesita grandes cantidades de ADN de buena calidad (sin contaminantes que interrumpan la reacción de las enzimas).

3.6.2 TÉCNICAS BASADAS EN EL PCR

Dentro de estas técnicas tenemos dos subgrupos:

a. Técnicas con iniciadores arbitrarios

Con la aparición de la técnica de PCR se dispuso de varias nuevas técnicas que carecían de las limitaciones que presentaban las técnicas de hibridación. Entre estas técnicas encontramos dos grupos:

- Técnicas con iniciadores de PCR de múltiple arbitrariedad

Los iniciadores arbitrarios se utilizaron junto con el PCR para amplificar diferentes regiones de ADN. Cada región contendría dos secuencias cortas complementarias a cada

iniciador aleatorio (ubicándose estas secuencias en hebras opuestas y no muy separadas) y la zona de amplificación.

La versión más utilizada dentro de este grupo de técnicas fue la amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPD), donde se separan los productos de amplificación en geles de agarosa en presencia de bromuro de etidio y visualizados por luz ultravioleta. Otras técnicas utilizadas fueron los iniciadores arbitrarios de PCR (AP-PCR) y las huellas de amplificación de ADN (DAF), los cuales diferían de los RAPD en tamaño y método de separación.

Presentan múltiples ventajas como el no requerir enzimas de restricción o información de las secuencias, no se utilizan técnicas de hibridación, es una técnica rápida, presenta bajos costos operativos, trabaja con bajas concentraciones de ADN y es automatizable. Sin embargo, era inconsistente y no mantenía su reproducibilidad, además de generar marcadores dominantes y problemas de comigración que dificultaban la asignación de las bandas.

- Polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados (AFLP)

Los AFLP son marcadores moleculares que combinan la digestión de enzimas de restricción y la técnica de PCR. Inicialmente se corta el ADN con dos enzimas (una de corte raro y otra de corte frecuente), para luego adherir (mediante el uso de la enzima ligasa) adaptadores de 1, 2 o 3 nucleótidos (pudiendo ser estos A, G, C o T). Estos adaptadores proporcionan secuencias conocidas a los iniciadores utilizados, y cuando estos reconozcan una secuencia amplificarán la región de ADN. Esta última etapa consiste de dos amplificaciones, una pre-selectiva, donde se emplean iniciadores que reconozcan un nucleótido arbitrario y luego, este producto de amplificación es empleado en una segunda amplificación selectiva empleando iniciadores que poseen dos nucleótidos selectivos adicionales al primero.

En la práctica se consiguen alrededor de 50 a 100 fragmentos amplificados por ADN, los cuales son separados por geles de poliacrilamida y revelados por rayos X, fluorescencia, marcadores no radioactivos y procedimientos de tinción con plata.

Los AFLP son aplicables a todas las especies y son reproducibles, son marcadores dominantes y altamente polimórficos. Sin embargo necesitan buena cantidad de ADN (0.3-10ug por reacción), son demandantes debido a sus dificultades técnicas.

b. Técnicas con iniciadores sitio específicas

Este grupo de técnicas se caracteriza por obtener los amplicones en base al diseño de iniciadores que amplifican regiones específicas del genoma. El conjunto de estas técnicas tiene como requisito el conocimiento previo de las secuencias a amplificar o a las secuencias flanqueantes de ésta. Entre los marcadores más utilizados en este grupo encontramos a los marcadores microsatélites (detallados adelante); u otras técnicas como la secuencia polimórfica amplificada y cortada (CAPS) o PCR-RFLP; y secuenciamiento por PCR.

Estos tipos de marcadores son altamente polimórficos y brindan gran cantidad de información al investigador. Así mismo revelan información sobre las relaciones filogenéticas. Pese a sus ventajas su diseño es costoso y demanda considerable cantidad de tiempo.

En la Figura 1, podemos observar la evolución y uso de los marcadores moleculares hasta el año 2003 (pese a su antigüedad ilustra dinámicamente el avance en técnicas moleculares). En la actualidad las técnicas moleculares han desarrollado rápidamente, descubriendo técnicas de secuenciación que permiten encontrar diferencias a nivel de nucleótidos, alguno de estos marcadores son los polimorfismos de nucleótido simple (SNPs), los microarreglos, entre otros. Estas técnicas a pesar de tener un difícil acceso en sus inicios hoy en día gracias a su atomización son de mayor acceso a diferentes programas de investigación por lo que será posible obtener mucha mayor cantidad de datos y en menor tiempo con tan solo mandar ADN a los diferentes laboratorios alrededor del mundo que ofrecen estos servicios (Schlötterer, 2004b).

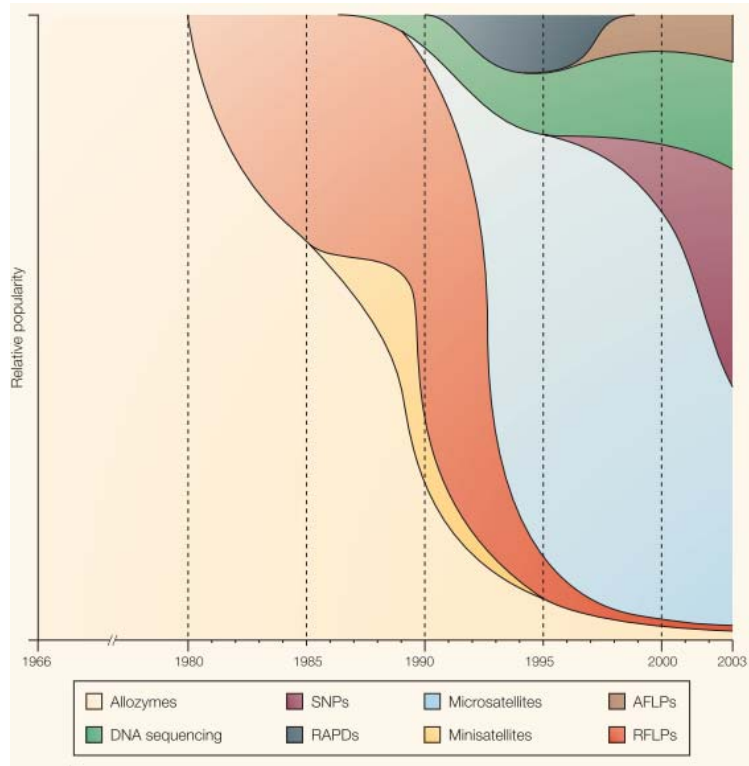


Figura 6. Evolución de los marcadores moleculares desde el año 1966 hasta 2003, tomado de Schlötterer (2004b).

Los descubrimientos en biología molecular de los últimos años han permitido abrir la posibilidad de emplear distintos tipos de herramientas moleculares para mejorar la identificación de variaciones genómicas en distintos organismos. En los últimos 15 años hemos sido testigos de nacimiento de distintas colecciones de marcadores moleculares con gran rendimiento, junto al cambio de manejo de detección manual a uno completamente automatizado.

3.7 MARCADORES MOLECULARES MICROSATÉLITES

3.7.1 GENERALIDADES

Se sabe que una gran proporción del genoma de organismos eucariontes está compuesta por secuencias variables repetidas en el ADN. Experimentos en los inicios de los 80 demostraron que los genomas eucariontes están densamente poblados por diferentes clases de secuencias repetidas, unas más complejas y otras más sencillas (Hamada *et al.* 1982). Un microsatélite consiste de dos regiones flanqueantes a una secuencia motivo repetida en

tándem. Ésta a su vez son secuencias de 1 a 4 (Ferreira & Grattapaglia 1998), de 1 a 9 (Hartl y Jones, 2009), o de 1 a 6 (Selkoe y Toonen, 2006) nucleótidos (la variación en el número de nucleótidos depende de las especies en estudio).

Los marcadores microsatélites han recibido diferentes nombres como secuencia objetivo de sitios microsatélites o en inglés “Sequence Tagged Microsatellite sites” (STMS) (Beckmann & Soller, 1990); repeticiones de secuencia simple (SSR en sus sigla en inglés); repeticiones en tándem de número variable o en inglés “variable number tándem repeats” (VNTR); y repeticiones en tándem cortas o en inglés “short tandem repeats” (STR), entre otros. Las secuencia motivo de los microsatélites tienen una alta frecuencia de mutación, debido a eventos de deslizamiento de la Taq polimerasa o errores en el editado durante la replicación de ADN, que vienen a ser los eventos principales en cambiar el número de repeticiones y así el tamaño del motivo (Eisen, 1999, citado por Selkoe y Toonen, 2006).

Un loci microsatélite típicamente varía en tamaño entre 5 a 40 repeticiones, siendo los motivos di-, tri- y tetranucleotidos los de mayor estudio en los análisis moleculares (Selkoe y Toonen, 2006). Li *et al.* (2002), muestra que las repeticiones de mononucleotidos, se encuentran en altas frecuencias, pero no son tomadas en cuenta por su baja confianza, ya que presentan problemas de amplificación.

Debido a que los alelos se diferencian en tamaño, se pueden distinguir a través de geles de poliacrilamida de alta resolución con gran detalle, permitiendo asimismo la fácil y rápida caracterización de una gran cantidad de individuos en corto tiempo. La mayoría de los microsatélites presentan una alta tasa de mutación, se ha encontrado desde 10^{-2} a 10^{-6} mutaciones por generación y un promedio de 5×10^{-4} , tales tasas generan una alta diversidad alélica de importancia para estudios genéticos de procesos que ocurren en escalas de tiempo cortos (Schlötterer, 2000). En plantas, los sitios de microsatélites están ampliamente distribuidos con una frecuencia de uno cada 50 mil pares de bases (Ferreira y Grattapaglia, 1998).

Los marcadores microsatélites presentan muchas ventajas sobre otros marcadores entre los que podemos mencionar bajos costes operacionales, codominancia, multiallelismo, hipervariabilidad, alta calidad de bandas, alta reproducibilidad de bandas, fáciles de automatización y permiten utilizar ADN de baja calidad (Spooner *et al.*, 2005).

A pesar de tener muchas ventajas sobre otros marcadores, los microsatélites también poseen muchos desafíos y dificultades que complican y confunden su análisis. Afortunadamente muchas de las desventajas pueden evitarse al momento del diseño de los iniciadores, para esto hay que tener en cuenta respetar la longitud mínima de 20 pb, un porcentaje mayor al 50% entre nucleótidos guanina y citosina (la especificidad disminuye si es que no se tiene) y por último la temperatura de “fusión” debe ser mayor 55°C.

Una de las desventajas es que los iniciadores raramente trabajan para todo un grupo taxonómico, por lo que tienen que desarrollarse para cada especie. Sin embargo, en la actualidad existe una alta cantidad de información y base de datos proporcionada por la bioinformática que minimizan este problema. Sin embargo, el diseño de iniciadores para especies no investigadas y de grupos taxonómicos lejanos todavía es un desafío (Schlötterer, 2004b).

3.7.2 USOS DE MICROSATÉLITES EN PAPA

Los marcadores microsatélites han sido usados en papa para estudios de diversidad, estructura genética, clasificación taxonómica, rastreo de migraciones de germoplasma, identificación, mapas de ligamiento genético, para establecer colecciones núcleo y para investigaciones de identificación de haplotipos compartidos en colecciones del banco genético (Ghislain *et al.*, 2008)

Para los estudios en diversidad uno de los factores que determina el uso de una técnica es su vigencia y el costo. Por ello, si se tiene un gran número de cultivares a analizar se necesitarán aquellas técnicas que permitan evaluar grandes números de muestras y loci. Otro de los aspectos importantes al momento de elegir una técnica molecular es su capacidad para trabajar con gran cantidad de datos y establecer, mediante análisis estadísticos estimaciones de diversidad entre y dentro de las poblaciones en estudio (Selkoe y Toonen, 2006).

3.8 SISTEMA LI-COR

En 1971, LI-COR Biosciences introdujo por primera vez instrumentos de medición utilizando haz de luz para investigación científica en plantas. En la década de 1980, LI-COR centró su investigación y desarrollo en el campo emergente de biotecnología y es así que el sistema de análisis LI-COR para secuenciamiento de ADN se convirtió en un estándar mundial para fiabilidad y exactitud.

La tercera generación de estos equipos introdujo el sistema analizador de ADN 4300, basado en la tecnología LI-COR Biosciences, permitiendo la detección de ADN utilizando marcadores fluorescentes. De esta manera, el sistema introdujo el uso de marcadores moleculares microsatélites y AFLP. Asimismo también se usó en las técnicas de inducción de lesiones en genomas locales objetivos o en inglés “*Targeting Induced Local Lesions in Genomes* (TILLING).

En el sistema LI-COR, los microsatélites son amplificados, usando fluorescencia en el infrarrojo. En el PCR por complementariedad de bases se incorpora el iniciador marcado con IRDyeTM (marcador infrarrojo) formando así parte del amplicon. Los fragmentos con cadena terminal marcada con IRDye se separan conforme su tamaño en un gel de poliacrilamida. Un láser excita el marcador infrarrojo del fragmento de ADN conforme este va migrando y pasa por la ventana de detección (LI-COR, 2003). Al final de la corrida el programa de cómputo traduce la información captada por los láseres, construyendo así imágenes, donde se aprecian las bandas amplificadas.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 MATERIALES

4.1.1 MATERIAL BIOLÓGICO

El total de muestras evaluadas correspondió a 516 cultivares nominales de papa nativa de la zona suroeste de departamento de Junín. La colección se estableció en base de encuestas a los comuneros y agricultores de la zona suroeste del departamento de Junín. Se eligieron de este modo las comunidades donde se han reportado un gran número de cultivares nativos de papa (comunicación personal con Stef de Haan). Los factores limitantes para la colecta fueron el acceso a las comunidades y los consentimientos previos firmados por los agricultores (donde aceptan compartir sus conocimientos andinos y el uso de su diversidad para la investigación), además se eligieron los principales ganadores de ferias de diversidad de cada comunidad. La iniciativa y estructuración del estudio es propuesto por el Centro Internacional de la Papa (CIP), en colaboración con el Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA) y la Organización sin fines de lucro YANAPAI.

Para la selección de los cultivares dentro de la población en estudio no se utilizaron sistemas de clasificación modernos (Ochoa, 1999; Huaman & Spooner, 2002; Spooner *et al.*, 2007), debido a que la información necesaria para utilizar esta clasificación son obtenidos recién después de la primera o segunda campaña (incluso es necesario contar con la intervención de curadores expertos para distinguir entre una u otra especie, comunicación personal con Stef de Haan). Por tal motivo la sección se realizó en base al conocimiento del agricultor, el cual reconoce cultivares en base a sus características morfológicas. Cada uno de los agricultores es capaz de identificar un máximo número de cultivares únicos con gran destreza y precisión. Es crítico mencionar que para la conservación *in situ* y búsqueda de diversidad es importante encontrar un número máximo de cultivares, siendo un cultivar la unidad básica de evaluación y no el número de especies distintas.

La colección provino de 3 provincias (Concepción, Jauja y Huancayo), comprendiendo 5 distritos en total: Comas, MasmaChicche, Paca, Quillcas y Pucara. Se trabajaron así mismo con 7 comunidades y 10 agricultores representantes de cada comunidad (considerando en los casos de MasmaChicche y Quillcas, 2 y 3 agricultores respectivamente, debido a una amplia diversidad distinta entre ellos). Se puede observar en la Tabla 2 el número de cultivares obtenidos por cada comunidad, distrito y provincia. El total de cultivares que aparece en la Tabla 2 es de 444, esto se debe a que se realizó una reducción de 72 cultivares debido a que presentaban alto contenido de datos moleculares perdidos (en la sección de resultados y discusiones se evaluó el resultado de esta reducción).

Tabla 2. Tabla resumen con rango códigos de los cultivares. Donde se pueden observar el número de cultivares por comunidad (NCC), distrito (NCD) y provincia (NCP) de la zona suroeste del departamento de Junín. RC rango de códigos.

RC	NCC	COMUNIDAD	NCD	DISTRITO	NCP	PROVINCIA
J001 - J054	48	Pomamanta	73	Comas	231	Concepción
J055 - J082	25	Racracaya				
J207 - J395	158	Marcavalle	158	Pucará		
J083 - J476	83	Masmachicche	83	Masmachicche	117	Jauja
J477 - J516	34	Paca Paccha	34	Paca		
J096 - J145	41	Rangra	96	Quillcas	96	Huancayo
J146 - J206	55	Quillcas				
					444	TOTAL

Además se obtuvieron las coordenadas geográficas referenciales de cada una de las comunidades en estudio (Tabla 3), utilizando la base de datos geográficos de comunidades andinas del CIP (comunicación personal con Franklin Plasencia, RIU-CIP). Estas coordenadas fueron ubicadas en el mapa político y geográfico de Junín, como se visualiza en la Figura 7 y Figura 8 respectivamente.

El rango de altitudes se encuentra desde los 3312 msnm (Quillcas) hasta los 4024 msnm (Racracaya), que también se puede observar en la Tabla 3. Todas las comunidades con excepción de Quillcas se ubican dentro de la región natural Suni donde se tiene en promedio un clima templado frío con una temperatura anual de 12 °C. Mientras que Quillcas se ubica dentro de la región natural Quechua, con climas variados, desde templado a templado frío dependiendo de la altitud, latitud y época del año, siendo las

temperaturas entre día y noche variables, esta región es considerada excelente para la actividad agrícola y ganadera (Brack, 1983).

Tabla 3. Latitudes, longitudes y altitudes de las comunidades en estudio.

COMUNIDAD	DISTRITO	PROVINCIA	DEPARTAMENTO	LATITUD	LONGITUD	ALTITUD
Pomamanta	Comas	Concepción	Junín	-11.75	-75.13	3877
Racracaya	Comas	Concepción	Junín	-11.74	-75.01	4024
Marcavalle	Pucara	Huancayo	Junín	-12.22	-75.11	3853
Paca Paccha	Paca	Jauja	Junín	-11.69	-75.53	3614
Rangra	Quilcas	Huancayo	Junín	-11.9	-75.23	3799
Quilcas	Quilcas	Huancayo	Junín	-11.94	-75.26	3312
Masma Chicche	Masma Chicche	Jauja	Junín	-11.79	-75.38	3673

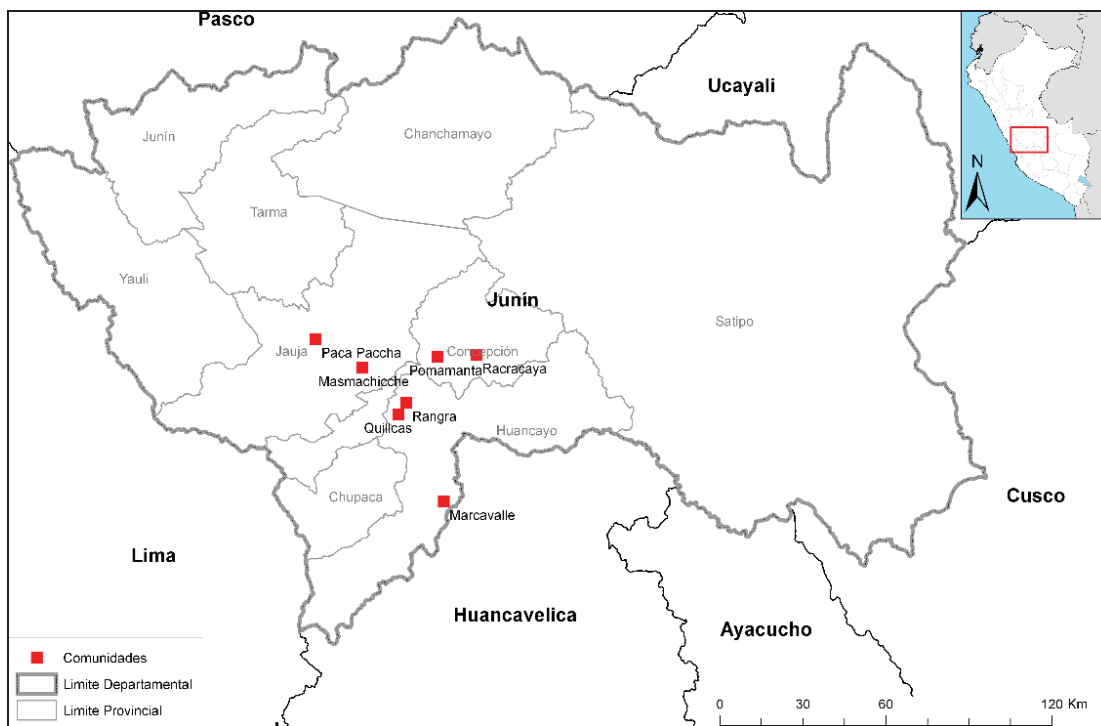


Figura 7. Ubicación de las comunidades en estudio en Mapa político de Junín (Comunicación personal, Flanklin Placencia, RIU-CIP).

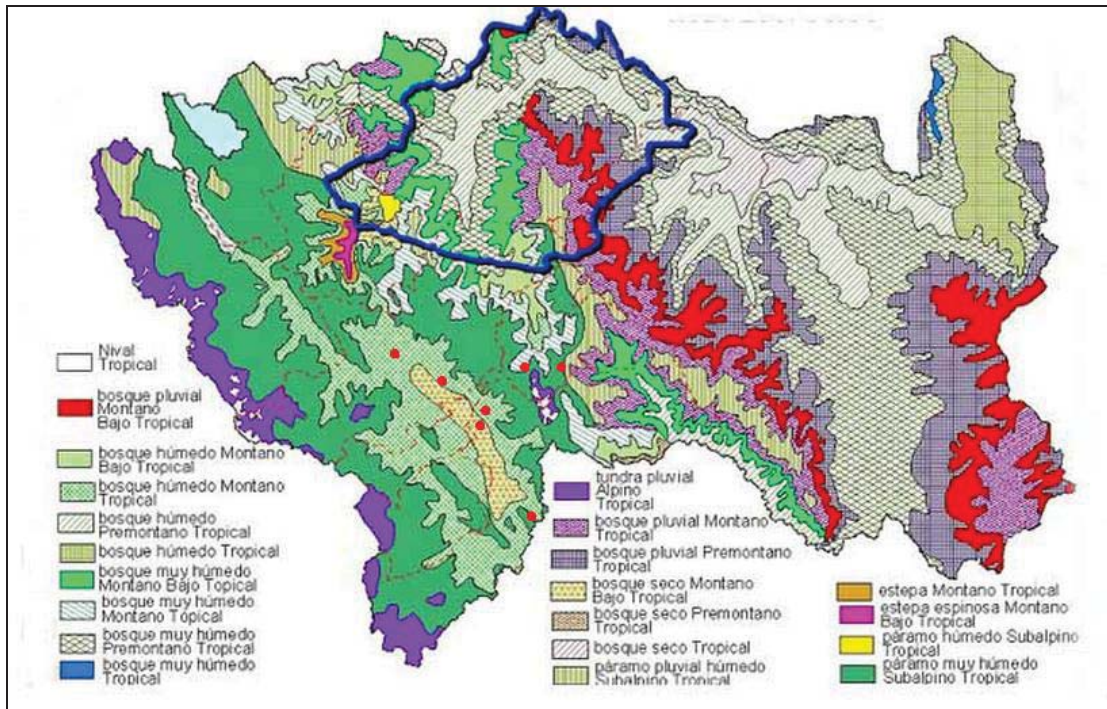


Figura 8. Ubicación de las comunidades en estudio sobre el Mapa geográfico de Junín.

4.1.2 MATERIAL QUÍMICO

- 2-amino-2-(hidroximetil)-1,3-propanoediol*THAM (Sigma)
- 2-Propanol (Merck)
- Ácido Borico
- Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA).
- Acrilamida (Sigma)
- ADN Fago Lambda (Gibco)
- Agarosa (Cibco, Ultra Pure™)
- Agua destilada
- Agua libre de nucleasas (Sigma)
- Alcohol 96 grados
- Alcohol Isoamilico (Sigma)
- ARNsas (Sigma)
- Azul de bromofenol
- Bromuro de cetil trimetil amonio (CTAB) (Aldrich)

- Buffer Blue Stop Solution (LI-COR, USA)
- Cianol xileno (Sigma)
- Cloruro de Magnesio (Sigma)
- Cloruro de Potasio (Sigma)
- Cloruro de Sodio (Merck)
- Dinocleotidos (dNTPS) (Sigma)
- Enzima Taq polimerasa
- Etanol absoluto (Merck)
- Hidróxido de Sodio (Merck)
- Iniciadores de microsátélites (Life Technologies)
- Iniciadores M13 (LI-COR)
- Isopropanol (MERCK)
- KB plus 6.5% gel Matriz (LI-COR)
- N,N,N',N'-Tetrametiletileno-diamina (TEMED)
- Naranja G (SIGMA)
- Persulfato de amonio (APS)
- Polivinilpirrolidona (PVP)
- Revelador Gel-red.
- Sucrosa
- Sulfato de amonio
- β -mercaptoetanol (Sigma)

4.1.3 EQUIPOS

- Agitador magnético (CORNING)
- Autoclave (Forge, Everett Mass)
- Balanza automática, modelo adventure pro (OHANS)
- Baño María, modelo 188 (Precision Scientific)
- Campana extractora LABCONCO (Protector Laboratoty Hood)
- Congeladora a -20°C y -70°C (Bosch)
- Destilador (Wheaton Instruments)
- Equipo LI-COR (LI-COR Bioscience)

- Fuentes de poder para electroforesis, modelo 250 (Bethesa Research Laboratories, Life Technologies)
- Fluorimetro TBS-380 (Turner BioSystems, USA)
- Horno de secado (Vacuum oven)
- Incubadora a 37°C (Precision Scientific)
- Liofilizador Speed Vac (Plus Savant, modelo SC110A)
- Máquina productora de cubitos de hielo (Scotsman)
- Microcentrifuga de 18 pozos, modelo 5415C (Eppendorf)
- Picocofuga para tubos de 1.7 y 2mL (USA Scientific)
- Picofuga de tubos en tiras de 200uL (USA Scientific)
- Microcentrifuga mini plate spinner (Labnet)
- Micropipetor multicanal de 10uL y 200uL
- Micropipetores de 0.1-2.5uL, 0.5-10uL, 1-20uL, 10-100uL y de 100-1000uL (eppendorf)
- Moledora para microtubos FastPrep-24 (MP_{TM}).
- Potenciómetro, modelo Orion 4 Star (Thermo Scientific)
- Pipetor repetitivo (eppendorf)
- Refrigerador 4°C (Sear)
- Standar heatblock (WWR)
- Termocicladores Veriti 96 thermal cycler (Applied Biosystems)
- Transiluminador EpiChemi3Darkroom (Biolmaging systems)
- Vortex

4.1.4 MATERIALES DE LABORATORIO

- Bolsas para autoclave.
- Cajas de tecknopor.
- Cajas y racks de almacenamiento.
- Cámara para electroforesis horizontal, modelo H4 (GIBCO)
- Campana extractora de gases
- Cinta adhesiva
- Cinta de autoclave.
- Computadora

- Espátula de plástico
- Esferas de cerámica
- Gradillas de plástico para 80 posos
- Guantes de plástico estériles.
- Matraces de 50, 100 y 200mL
- Moldes para geles de agarosa
- Papel aluminio
- Papel toalla
- Peines para geles de agarosa y poliacrilamida
- Piceta de 500mL
- Pinzas de acero
- Placas de dilución de 96 pocillos
- Plumones marcadores indelebles
- Probetas de plástico de 1000 y 2000mL
- Probetas de vidrio de 50, 100 y 1000mL
- Puntas de plástico para pipetor repetitivo de 50uL y 5mL
- Puntas plásticas de 0.1 a 10uL
- Puntas plásticas de 1000uL
- Puntas plásticas de 100uL
- Saram wrapTM
- Tapas para placas de 96 pocillos.
- Tubos para microcentrifuga de 0.6, 1.7 y 2.0 mL
- Tubos en tiras de 200uL
- Vaso de precipitado de 50, 100, 200 y 500mL
- Vaso de precipitado de 500mL

4.1.5 PROGRAMAS DE CÓMPUTO

- DARwin 5.0 (CIRAD-FHHOR 2009)
- Saga Generation (LI-COR-Bioscience)
- Arlequin 3.5.1.2 (Swiss Intstitute of Bioinformatics)

4.2 MÉTODOS

4.2.1 MUESTREO DE MATERIAL BIOLÓGICO

Los cultivares fueron sembrados y mantenidos a lo largo del proyecto y en cada campaña. Sin embargo para su fácil estudio se sembró una réplica de toda la colección en los campos experimentales de INIA en Santa Ana – Huancayo, donde se sembraron 5 repeticiones por cultivar en cada surco. Se colectó de esta manera, de 2 a 4 hojas (dependiendo del tamaño) de solo una planta por surco (sin repetición). La colección ubicada en la estación se obtuvo de los departamentos de Concepción, Jauja, Huancayo y Chupaca. En la Tabla 2, podemos observar los detalles de las comunidades en estudio dentro de cada departamento, como también los agricultores que compartiendo sus conocimientos para la identificaron de los cultivares.

Para la extracción de ADN se colectaron las hojas, éstas fueron conservadas en papel toalla (debidamente rotuladas) y dentro de pequeños paquetes de plástico (rotulados). Posteriormente se humedecieron ligeramente con agua destilada y se mantuvieron en refrigeración hasta el traslado a Lima para su posterior proceso en laboratorio.

4.2.2 EXTRACCIÓN DE LOS ÁCIDOS NUCLEICOS

Para la extracción se utilizó el tejido foliar más joven de los cultivares de papas nativas recolectados en campo y llevados 2 días después al laboratorio (manteniendo en frío las muestras). La extracción se realizó según el protocolo de Doyle y Doyle (1990), modificado a pequeña escala por el CIP, este se puede encontrar detallado en el ANEXO II.

4.2.3 EVALUACIÓN DE LA CALIDAD Y CUANTIFICACIÓN DE ADN

Las pruebas de calidad se realizaron en gel de agarosa al 1%, mediante electroforesis, se utilizó como patrón de referencia el fago *Lambda* digerido con la enzima de restricción *Pst* I. Para la preparación de la muestra, se añadió 1ul del ADN extraído (diluido en T₁₀E₁) disuelto en 9 ul de tampón de carga SALB1X mas colorante intercalante de ADN, Gel Red. Se utilizó la solución tampón TBE 1X para la electroforesis y se corrió durante 50

minutos a 90 voltios. Se revelaron los geles con la ayuda de un transiluminador ultravioleta. Esta prueba se realizó con el objetivo de evaluar la presencia de ADN extraído, concentración aproximada e integridad de la banda (caso contrario su degradación).

Para cuantificar las muestras de ADN extraído se utilizó el Fluorímetro TBS-380. La cuantificación se realizó muestra por muestra, añadiéndose a cada una el reactivo Picogreen, el cual tiene la propiedad de intercalarse en la doble hebra de ADN, permitiendo su detección con la ayuda de un espectrofluorímetro. Se utilizó como patrón ADN de Salmon, siendo la concentración de este de 500bg/ul. Se realizaron tres repeticiones y se tomó como concentración final el promedio de estas para las placas de dilución.

4.2.4 DILUCIÓN DE ADN

Una vez que se obtuvo las concentraciones finales de ADN para cada cultivar se realizaron diluciones de los mismos en placas de 96 pocillos, llevándolas a una concentración inicial de 100ng/uL con agua libre de nucleasas (ANEXO III): esta caja fue nombrada como “caja de ADN stock”. A partir de esta caja se diluyó una vez más con agua libre de nucleasas a una concentración de 5ng/uL, en una nueva placa (caja para la amplificación). Esta se mantendrá a 4°C, debido a su uso constante. La caja con ADN stock se mantendrá a -20°C.

4.2.5 AMPLIFICACIÓN DE MICROSATÉLITES

a. Set de identificación genética de papa

Para la amplificación del ADN se utilizó la técnica de PCR (explicación de la técnica en ANEXO IV) con un total de 23 iniciadores del set de identificación genética de papa o en inglés de Potato Genetic Identity kit (PGI Kit) (Ghislain *et al.*, 2008). El propósito del desarrollo del set fue de seleccionar microsatélites con amplia cobertura genómica dentro de los grupos taxonómicos de papa cultivada, que tengan altos valores de contenido de información polimórfica y tengan de igual manera clara resolución al momento de caracterizarlos Ghislain *et al.*, 2008).

Estos microsatélites fueron seleccionados en base a su calidad, cobertura genómica (se seleccionaron 2 SSR por cromosoma) y contenido de información polimórfica. Así mismo se utilizaron marcadores de peso específicos para cada iniciador. Estos se obtuvieron mezclando los ADN extraídos de plantas del banco genético del CIP, que habían sido genotipados con anterioridad y por ello el tamaño de cada alelo era ya conocido (Ghislain et al. 2008).

El set de identificación genética de papa cultivada puede utilizarse para diferentes objetivos, como: caracterizar germoplasma de papa, identificación de variedades, verificación de identidad del germoplasma, identificación de duplicados y manejo de bancos genéticos.

b. Protocolo de amplificación

Las amplificaciones de los microsatélites se realizaron mezclando 5ul de ADN a 5ng/uL con 5uL de la mezcla maestra, que contiene: 2.5uL de agua libre de nucleasas (NFW), 1uL de buffer Bobs a 10X (ver preparación en ANEXO VI), 0.4uL de dNTPs a 5mM (ver preparación en AnexoV), 0.2uL del iniciador de sentido a 1uM, 0.3 del iniciador de antisentido a 1uM, 0.3uL del iniciador marcado con fluerescencia a 1uM y 0.3uL de Taq polimerasa diluído 1:4 Buffer Taq.

Las amplificaciones se llevaron a cabo en los termocicladores Veriti 96 well Thermal Cycle, (Applied Biosystems), mediante el programa detallado en la tabla 4. Inicialmente se utilizaron las temperaturas de hibridación y el número de ciclos se de cada SSR, según el manual para la identificación genética de papa (Herrera y Ghislain, 2000), En la tabla 6 podemos observar las temperaturas de hibridación para cada microsatélite y el número de ciclos utilizado. Para 6 SSR se cambió las temperaturas de hibridación originales por problemas de presencia de artefactos (Tabla 6). La presencia de artefactos es generada por la incorrecta hibridación de los SSR a las secuencias específicas, esto podría estar explicado debido a que el set de microsatélites de papa fue diseñado en base a especies tetraploides del genero *S. tuberosum subsp. tuberosum*. Al aumentar la temperatura de hibridación se buscó que el porcentaje de hibridación a las secuencias específicas se incremente, generando asi imágenes limpias de artefactos.

Tabla 4. Programa de PCR, tiempos y temperaturas.

CICLOS	TEMPERATURA (°C)	TIEMPO (min)
1	94	4
	T° hibridación	1
	72	1
29-31	94	1
	T° hibridación	1
	72	1
1	72	5
	4	∞

4.2.6 ELECTROFORESIS DE LOS PRODUCTOS AMPLIFICADOS

Después de la amplificación de los microsátélites se añadió a cada una de las reacciones 5uL de *buffer Blue Stop Solution*, para inactivar la Taq-polimerasa y así detener la reacción en cadena totalmente. Antes de realizar la corrida electroforética en los equipos LI-COR, se desnaturaliza cada uno de los productos de amplificación a 94 °C por 1 minuto en el equipo Standar heatblock WWR. Luego se colocaron las muestras en hielo y cargaron en geles desnaturalizantes de policrilamida: acrilamida al 6.5% y urea 7M. A continuación se realizó la electroforesis vertical en el sistema automatizado LI-COR 4300 a 150 voltios en tiempos que variaron de 70 a 100 minutos dependiendo tamaño esperado para cada uno de los microsátélites. La electroforesis se realizó en un medio con amortiguador TBE 1X.

4.2.7 DETECCIÓN, EVALUACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE AMPLICONES

Las imágenes obtenidas se calibraron con el programa Saga^{GT} TM versión 3.3, siguiendo las indicaciones del manual de Saga^{GT}. Este programa permitió visualizar y calibrar los pesos moleculares para las bandas que migraron y fueron reconocidos por los láseres a longitudes de onda de 700nm y 800nm (LI-COR, 2003).

Durante la caracterización se obtuvo la información de presencia y ausencia de los alelos. Se codificó la presencia de los alelos con el número 1 y la ausencia con el número 0. De igual forma se codificaron con el número 9 tanto los datos perdidos, como los alelos nulos. Sin embargo, en esta investigación en la que se usó microsátélites altamente polimórficos, la presencia de alelos nulos en la población tiene una baja tasa de ocurrencia.

La calibración de geles para su posterior caracterización se realizó utilizando marcadores de peso conocidos para cada microsatélites. Estos marcadores permiten calibrar los geles con mayor precisión que los marcadores comerciales de LI-COR, ya que se sitúan en la zona de amplificación de cada microsatélites. La caracterización se realizó de forma manual usando el programa Saga^{GT}, tomándose en cuenta solo bandas nítidas.

Es importante conocer que el equipo LI-COR y el programa de computo Saga^{GT} se diseñaron para evaluar organismos diploides, por lo que para caracterizar papas triploides, tetraploides y pentaploides la caracterización se realizó sectorizando grupos de bandas de dos en dos y caracterizando de esta manera cada zona independientemente.

4.2.8 OBTENCIÓN DE LA BASE DE DATOS

Después de la identificación y caracterización manual de alelos, el programa Saga^{GT}, permitió reportar la información a tablas Excel. Estas tablas muestran los pesos moleculares de los alelos que se caracterizaron en el gel. Se obtuvo la tabla binaria mediante el uso de un convertidor macro en línea programado y suministrado por el área de informática del CIP (comunicación personal Oswaldo Chávez). El programa permitió traducir la información de pesos moleculares en códigos binarios de presencias, ausencias y datos perdidos, por ejemplo: si es que un iniciador “a” tiene un total de 4 alelos (con pesos moleculares 200, 205, 210 y 230) y el ADN del cultivar 1 solo tiene 1 de estos alelos (205), entonces el cultivar 1 para el peso 205 tendrá un estado igual a 1 (presencia de la banda con peso molecular 205), los demás alelos aparecerán con estado 0 (ausencia para las bandas 200, 210 y 230).

Se siguió este análisis generando la matriz de datos binarios. No se repitieron las amplificaciones donde no se presenciaron alelos. La caracterización de alelos nulos no fue necesaria para los objetivos del presente estudio, no repercutieron en la estimación de diversidad, debido a que su porcentaje es muy bajo.

4.2.9 ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

Frecuencia y riqueza alélica

Las frecuencias alélicas relativas se calcularon a partir de la matriz de datos Excel (matriz de presencia y ausencias de alelos) para cada locus, dividiendo el número de alelos presentes entre la totalidad de alelos para un locus dado, tal y como muestra la siguiente ecuación:

$$x_j = \frac{n_j}{N}$$

Dónde:

X_j = frecuencia del *j*-ésimo alelo en el locus *i* de la población

n_j = Número de repeticiones del alelo *j* en el locus *i*

N = Número total de alelos en el locus *i*

La riqueza alélica se determinó a partir de la matriz de datos Excel mediante el conteo del número de alelos distintos dentro de la población y para cada comunidad. Asimismo se determinó el número de alelos comunes y únicos para la colección.

b. Determinación de la Heterocigocidad esperada (He)

La heterocigocidad esperada (He_i) se calculó mediante la fórmula corregida de Nei (Nei, 1987), su valor se calcula mediante la siguiente ecuación:

$$He_i = \frac{n}{n-1} \left(1 - \sum_{j=1}^m x_j^2\right)$$

Dónde:

n = número de individuos en la población

x_j = frecuencia del j-esimo alelo en el locus i

m = número de alelos observados en el locus i

He_i = probabilidad de que 2 alelos tomados al azar de la población sean diferentes en el locus i.

La heterocigocidad (He) es también conocida como diversidad genética de Nei (Nei, 1973). Sin embargo para papa nativa esta definición no es del todo correcta ya que el cultivo de papa proviene de cruces al azar. Por este motivo, la He se calculó para el presente estudio como un aproximado de la verdadera. Otro de los motivos, por los cuales no se puede hayar la He verdadera, es que las papas nativas de la presente investigación son un grupo heterogéneo, con distintas ploidías y por esta razón presentan frecuencias genéticas poblacionales diferentes. Como se mencionó anteriormente no es posible determinar el dosaje genético en poliploides a través de un método validado, por lo que no es posible determinar las frecuencias genéticas pero si las frecuencias alélicas. De esta manera se obtuvieron las frecuencias alélicas tomando en consideración a los marcadores microsatélites como marcadores dominantes (Rocha *et al.*, 2010; Falush *et al* 2007) y son estas las que se usaron para aproximar el valor de He esperada.

Al valor de He se le multiplicó el valor de corrección de Bessel (Allen y Savage, 2007), este factor es usado para corregir el sesgo estadístico en la estimación de la varianza poblacional (generado por motivos de selección, información o variables de confusion). De esta manera se multiplica el valor de He por el valor de n/(n-1), donde n es el número de cultivares de las muestras evaluadas. El valor obtenido de He final será así un estimado de diversidad poblacional y no solo de la colección en estudio.

c. **Determinación del contenido de información polimórfica**

Conocido también como PIC (Polymorphic Information Content), siendo este la probabilidad de identificar que homólogo de un parental dado será transmitido a la siguiente generación (Ferreira y Grattapaglia, 1998). Su valor se calcula mediante la siguiente:

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^k p_i^2$$

Dónde:

P_i : Frecuencia alélica relativa del enésimo alelo en el locus dado.

i y k : Límite inferior y superior para el número de cultivares.

Debido a que la población total analizada es un grupo de diferentes cultivares (con diferente número de ploidía, diferentes frecuencias alélicas y otras características) el índice de Nei se usó como índice de contenido polimórfico (PIC), el cual estima la eficiencia de cada marcador para determinar polimorfismos en un locus dado (Smith *et al.*, 1997; Soto, 2006). De igual manera que para los valores de H_e , los valores de PIC fueron corregidos con el valor de corrección de Bessel ($n/n-1$).

d. **Matriz de disimilitud**

Las matrices de disimilaridad son llamadas también matrices de proximidad, ya que ayudan a discernir qué tan próximo se encuentran los individuos entre sí. La matriz de disimilaridad se creó a partir de resultados de presencia y ausencia (resultado de la caracterización de alelos de imágenes LI-COR). Se tomaron en cuenta para la construcción de la matriz solo aquellos cultivares que no superen el 5% de datos perdidos.

Para la creación de la matriz se utilizó el coeficiente de Jaccard, que ha sido utilizado en diferentes investigaciones de similaridad y diversidad en papa (de Haan *et al.*, 2013; Ghislain *et al.*, 2008; Spooner *et al.*, 2007; Soto, 2006 y Condori, 2003). La similaridad de Jaccard es comúnmente utilizado como un índice para variables binarias y

es definido como el coeficiente de la intersección entre la unión de las variables en comparación:

$$d^{JAS}(i, j) = \frac{J11}{J01 + J10 + J11}$$

La disimilaridad de Jaccard se define como $d^{JAD} = 1 - d^{JAS}$. Donde d^{JAD} es la distancia entre dos objetos i y j , para “ n ” variables binarias. En algunos casos, la similitud de Jaccard se calcula como $D_{jas} = 2dBCD / (1 + DBCD)$, donde DBCD es la disimilitud de Bray-Curtis (tal y como lo utiliza el software DARwin).

e. Análisis de agrupamiento

Una vez obtenida la matriz de disimilitud, se procedió al análisis de agrupamiento, utilizando el algoritmo de agrupamiento por medias no ponderadas (UPGMA) utilizado en diferentes investigaciones de análisis de diversidad (papa (de Haan *et al.*, 2013; Ghislain *et al.*, 2008; Spooner *et al.*, 2007; Soto, 2006 y Condori, 2003). Con este método es posible agrupar los cultivares usando métodos fenéticos y generando dendogramas, el método UPGMA permitió la construcción de fenogramas taxonómicos, o árboles que agrupan unidades operacionales taxonómicas (OTUs) por similitud fenotípica o genotípica. Mediante este análisis es posible partir o dividir una población de “ n ” objetos o individuos en un número determinado de subgrupos, optimizando el grado de homogeneidad interna de cada uno de éstos (Condori, 2003).

El principio de este método es encontrar pares de unidades taxonómicas operacionales que reducen al mínimo la longitud total de la rama (OTUs vecinos) en cada etapa de la agrupación. Las longitudes de las ramas, así como la topología del árbol se consiguieron como consecuencia del cálculo de los valores de similitud de cada accesión con las accesiones totales más cercanas y así formar una primera matriz derivada. Este valor es obtenido al realizar la media aritmética no ponderada de cada accesión de la matriz anterior con cada accesión del grupo. Posteriormente, se van formando grupos y estimar los árboles filogenéticos se utilizó en método “*Neighbor Joining*” (NJ) (Saitou y Nei, 1987). Este método obtiene el árbol que más cercano al árbol filogenético verdadero (no siendo éste siempre en de menor longitud) (Rolhf, 1992).

El agrupamiento UPGMA se usó para la generación de dendogramas en el programa DARwin (Perrier y Jacquemoud, 2006). La utilización del programa DARwin tuvo como objetivo principal obtener las matrices de disimilaridad la distribución de los cultivares en el árbol filogenético y la identificación de haplotipos compartidos.

f. Análisis de la Variancia Molecular (AMOVA)

En base a la matriz de datos binarios se calculó la variancia de frecuencias génicas dentro y entre las comunidades en estudio usando en análisis de varianza molecular (AMOVA, utilizando el programa Arlequin 3.1 (Excoffier *et al.*, 2005).

Se estudió de esta manera tal como definió Cockerham (1969, 1973) la estructura genética de las poblaciones mediante un sistema de análisis de varianza. AMOVA principalmente es similar a otros enfoques que basan el análisis de varianza en las frecuencias génicas, sin embargo AMOVA toma en cuenta el número de mutaciones o diferencias entre los haplotipos moleculares. En un principio se utilizó AMOVA en poblaciones humanas con el objetivo de analizar los perfiles de RFLP de ADN mitocondrial (Excoffier *et al.*, 1992). Luego AMOVA se utilizó para estudios de ecología animal (Huff *et al.*, 1993), vegetal (Paffeti *et al.*, 1998) y microbiana (Mengoni *et al.*, 2000) utilizando RAPDs, microsátélites y secuencias de ADN respectivamente. De esta forma se han venido evaluando poblaciones de cultivos vegetales, Liu *et al.* (2003), analizo la estructura genética entre grupos de líneas puras de maíz utilizando AMOVA y determinó que el mayor porcentaje de variación genética se daba dentro de los grupos y no entre ellos. En otro estudio realizado por Pusadee *et al.* (2009), se analizó el grado de diferenciación genética de una variedad nativa de arroz proveniente de diferentes subpoblaciones y se encontró una diferencias genética significativa entre estas. Para el cultivo de papa, de Haan *et al.* (2010) utilizo AMOVA para comparar la estructura genética de subpoblaciones de papas nativas del departamento de Huancavelica.

Al momento de definir grupos de poblaciones, lo que se está definiendo en una estructura genética particular que será evaluada, en este sentido para la presente investigación se realizó el agrupamiento de las papas nativas por comunidades (7 en total). Para el presente estudio cada una de los cultivares nominales de papa nativa fue

representado por un haplotipo. En la Tabla 5 se muestra los valores de variación que se calcularon entre las fuentes de variación.

Tabla 5. Representación de los componentes que definen un AMOVA.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados (SC)	Cuadrados medios esperados
Entre Poblaciones (P) dentro de los Grupos	P - G	SC (Entre Poblaciones/ dentro de los Grupos)	$\sigma_b^2 + \sigma_c^2$
Entre Individuos (N) dentro de las Poblaciones	N - P	SC (Entre Individuos/ dentro de las Poblaciones)	σ_c^2
Total	N - 1	SC (Total)	σ_t^2

La variación genética según AMOVA puede estar repartida dentro de las poblaciones o entre las poblaciones asignadas. Una población se define como población estructurada genéticamente si es que encontramos que el porcentaje de variación entre las poblaciones es alto en comparación con la variación dentro de las poblaciones (Excoffier *et al.*, 1992).

El análisis de varianza molecular (AMOVA) permite describir la variación genética entre 3 niveles, sin embargo para la presente investigación se utilizó solo el dos, entre las comunidades y entre los individuos dentro de cada comunidad.

V. RESULTADOS Y DISCUSIONES

5.1 ANÁLISIS EXTRACCIÓN DE ADN, PRUEBAS DE CALIDAD Y CUANTIFICACIÓN

Se extrajo el ADN de 516 cultivares de la zona suroeste del departamento de Junín, algunas de las pruebas de calidad se pueden observar en la Figura 9, en las que se obtuvieron 502 ADN sin degradación y de buena calidad (bandas intensas y sin degradación). Además se obtuvieron 12 ADN parcialmente degradados.

Debido a que los microsatélites son usualmente cortos de tamaño (100 -300 bp) pueden ser amplificados incluso con ADN degradados parcialmente, sin interferir en su amplificación (Taberlet *et al.*, 1999). Por tal motivo la degradación de estos 12 ADN no impidió que se tomen en cuenta para su posterior amplificación.

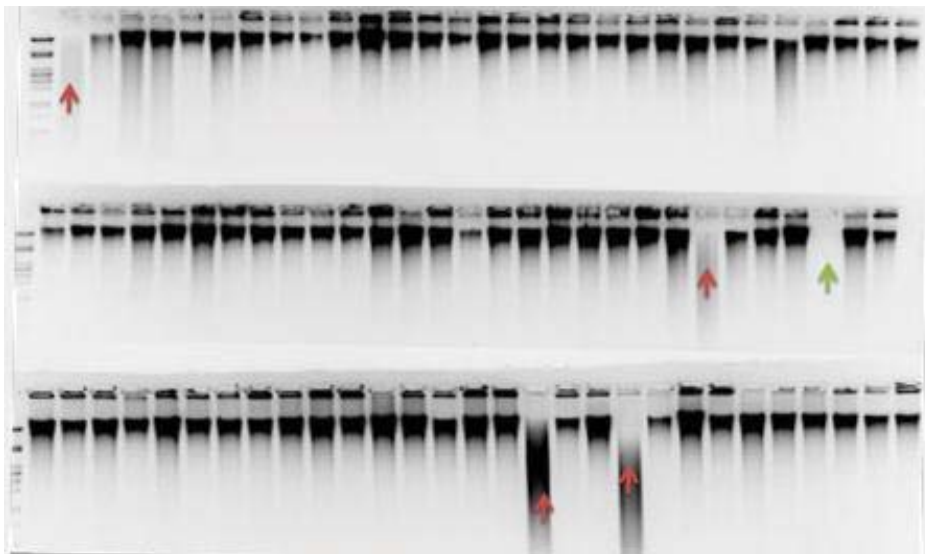


Figura 9. Pruebas de calidad de ADN en agarosa. En la figura se pueden observar algunas de los ADN extraídos en agarosa 1%. Las flechas en rojo señalan los ADN degradados mientras que la verde señala que no se visualizó muestra.

Las concentraciones encontradas para los ADN extraídos, mediante su detección con el fluorímetro, se encuentran en un rango de concentración de 200 a 250 ng/uL para el 86%

de la población. Estas se diluyeron hasta obtener las 2 cajas de diluciones por cada 96 ADN, una a 100ng/uL y la segunda a 5 ng/uL.

Se comparó la relación entre la concentración de ADN y la presencia de bandas en los geles de agarosa de los 12 ADN parcialmente degradados encontrándose cada uno de éstos dentro del rango de concentraciones de 200 a 250 ng/uL. Por otro parte se encontraron que las concentraciones menores a 100ng/uL no necesariamente tenían relación con la intensidad y calidad de las bandas, siendo en varios casos la intensidad igual en bandas con concentraciones mayores a 200ng/uL que bandas con concentración menor a 100ng/uL.

Por lo presentado se puede conjeturar que no existe una relación clara entre la cantidad y la calidad de las bandas de ADN, el hecho de que existan concentraciones elevadas no implica que la calidad de sus bandas sea buena o viceversa, por tal motivo siempre es importante realizar las dos pruebas ya que son complementarias y ayudan a explicar la incorrecta amplificación de las muestras.

5.2 ANALISIS DE MICROSATÉLITES UTILIZADOS

5.2.1 MICROSATÉLITES CONSIDERADOS PARA LA EVALUACIÓN DE DIVERSIDAD

De los 23 loci microsatélites trabajados inicialmente se tuvieron que eliminar del análisis 2 de estos: el STI0003, debido a que presentaban alelos adicionales que parecían repeticiones de un mismo patrón y alelos borrosos, imposibilitando la caracterización de alelos. Debido a que STG0001 presentaba dos morfologías de bandas, y sombras que impedían determinar los pesos moleculares de diferencias de 1pb.

Para estos dos iniciadores se evaluó como influía el cambio de temperatura de hibridación en más y menos 2 grado Celsius, pero no se encontraron diferencias en las amplificaciones. Por falta de recursos y tiempo no se pudieron modificar otras condiciones para optimizar las amplificaciones para esta pareja de iniciadores, tomando la decisión de no caracterizarlos, ni tomarlos en los análisis finales.

Con el objetivo de reducir la aparición de artefactos no deseables (sobras, espejos y tartamudeos), se modificaron las temperaturas de hibridación de 6 microsatélites:

STM1064, STPoAc58, STM0031, STM1106, STM5121 y STG0010 (se controló que dicho cambio no restrinja la visualización de las bandas). Solo para un caso se redujo la temperatura permitiendo definir mejor los amplicones que se encontraban tenues con la temperatura original (STM5121). Los cambios de temperatura se pueden observar en la Tabla 6. Los cambios realizados en las condiciones del PCR permitieron eliminar sombras y ruidos en los geles, permitiendo así presentar resultados robustos, de mayor credibilidad y precisión al momento de caracterizarlos.

La capacidad de detectar cultivares polimórficos es evidenciado también en la Tabla 10, donde podemos observar el número de alelos totales para cada uno de los microsátélites, siendo aquellos con mayor número de alelos los siguientes: STM1052, STM5127, STI0012, STM1106 y STI0030.

Tabla 6. Microsatélites utilizados para la caracterización de papas cultivadas. Donde TH O. es la temperatura de hibridación original y TH M. la modificada. Co.O es el código original del microsatélite y Co. L es el código utilizado dentro del laboratorio para facilitar su manejo.

¹ Rango de alelos obtenidos de la zona sur oeste del departamento de Junín

² Rango de alelos obtenidos del banco de datos moleculares CIP

N	INICIADORES		TH O.(C°)	TH M. C°)	NUMERO DE CICLOS	RANGO DE ALELOS ¹	RANGO DE ALELOS ²
	Co.O	Co. L					
1	STM1064	S027	52	54	31	206-209	199-215
2	STP0Ac58	S029	57	59	30	245-263	242-265
3	STM1053	S036	52	*	30	183-192	168-198
4	STM0037	S042	48	*	31	89-133	85-135
5	STM0031	S052	56	58	30	185-211	186-212
6	STM1104	S081	55	*	29	181-195	176-201
7	STM1052	S084	50	*	30	226-256	214-263
8	STM1106	S101	49	51	29	145-211	145-211
9	STM5114	S114	60	*	29	299-314	299-322
10	STM5121	S121	50	49	30	300-309	297-309
11	STM5127	S127	52	*	30	248-291	248-291
12	STG0001	S179	58	*	29	*	137-163
13	STG0010	S188	58	60	30	177-182	175-192
14	STG0016	S194	55	*	31	143-172	137-177
15	STG0025	S203	56	*	30	215-219	208-223
16	STI0001	S209	60	*	30	194-212	194-215
17	STI0003	S210	60	*	30	*	137-188
18	STI0004	S211	60	*	31	95-121	83-126
19	STI0012	S214	56	*	30	183-234	183-234
20	STI0014	S216	54	*	30	136-151	127-157
21	STI0030	S224	58	*	31	104-125	94-137
22	STI0032	S225	61	*	29	127-148	127-148
23	STI0033	S226	61	*	30	131-155	131-155

5.2.2 EVALUACIÓN DEL CONTENIDO DE INFORMACIÓN POLIMÓRFICA (PIC) PARA LOS MICROSATÉLITES

En base a la Tabla 7, podemos observar que los valores más bajos de PIC se encuentran principalmente para 3 microsatélites, siendo estos: El STM1064, STG0025 y STI0033.

Los microsatélites mencionados presentan una baja capacidad para detectar polimorfismo de la colección en estudio. Sin embargo esto no quiere decir que estos microsatélites no son buenos en detectar polimorfismos en el cultivo de papa, Ghislain *et al.* (2008), encontró valores de PIC mayores a 0.5 para estos tres microsatélites. Por lo tanto es posible que los cultivares de papa de la zona sur oeste de Junín (y alrededores) carecen de la presencia de estos alelos por procesos de mutación, deriva genética, flujo genético o cambio evolutivo dentro de la región.

Tabla 7. Valores de PIC para comunidades y colección total.

N	SSR	PIC							TOTAL
		POMAMANTA	RACRACAYA	RANGRA	QUILLCAS	MARCAVALLE	MASMA CHICCHE	PACA PACCHA	
1	STM1064	0.310	0.299	0.391	0.291	0.319	0.268	0.336	0.310
2	STP ₆ Ac58	0.713	0.798	0.759	0.732	0.725	0.723	0.777	0.730
3	STM1053	0.649	0.656	0.649	0.669	0.652	0.665	0.660	0.650
4	STM0037	0.673	0.710	0.697	0.713	0.709	0.724	0.749	0.708
5	STM0031	0.653	0.675	0.667	0.691	0.614	0.621	0.720	0.641
6	STM1104	0.863	0.872	0.835	0.839	0.888	0.902	0.905	0.871
7	STM1052	0.775	0.798	0.798	0.808	0.801	0.803	0.813	0.797
8	STM1106	0.836	0.861	0.853	0.830	0.829	0.832	0.861	0.831
9	STM5114	0.662	0.696	0.685	0.669	0.655	0.684	0.725	0.668
10	STM5121	0.690	0.707	0.670	0.626	0.679	0.654	0.615	0.664
11	STM5127	0.810	0.864	0.833	0.823	0.821	0.838	0.820	0.823
12	STG0010	0.516	0.613	0.594	0.625	0.601	0.562	0.582	0.583
13	STG0016	0.731	0.816	0.709	0.692	0.711	0.781	0.746	0.742
14	STG0025	0.150	0.342	0.130	0.158	0.205	0.174	0.108	0.182
15	STI0001	0.613	0.638	0.653	0.630	0.604	0.632	0.673	0.620
16	STI0004	0.526	0.699	0.654	0.672	0.599	0.584	0.701	0.616
17	STI0012	0.661	0.636	0.754	0.753	0.679	0.675	0.740	0.693
18	STI0014	0.697	0.681	0.685	0.688	0.684	0.655	0.706	0.676
19	STI0030	0.739	0.840	0.769	0.817	0.796	0.788	0.827	0.790
20	STI0032	0.742	0.743	0.693	0.746	0.718	0.718	0.751	0.720
21	STI0033	0.212	0.303	0.239	0.308	0.258	0.321	0.472	0.291

5.3 CULTIVARES CONSIDERADOS PARA LA EVALUACIÓN DE DIVERSIDAD

De los 516 cultivares analizados 72 de estos obtuvieron un porcentaje de datos perdidos mayor al 5%, razón por la cual no se tomaron en cuenta para el análisis final. Se trabajó solo con 444, donde los datos perdidos eran menores al 5%. Debido a la elección de 444 cultivares se perdió información de 2 alelos, teniéndose solo 160 de los 162 iniciales encontradas para los 516 cultivares. Los análisis y evaluaciones se realizaron en base a los 444 cultivares, para así obtener resultados más confiables y representativos.

Es importante mencionar que la no amplificación de estos 72 también se debió a la presencia de alelos nulos, es decir cultivares que no presentaron productos de amplificación detectables en ninguna de las repeticiones que se realizaron. Los alelos nulos son producidos por procesos de mutación como inserciones o deleciones que ocurren en las

regiones flanqueantes al motivo repetitivo o microsatélite, por lo tanto inhiben o anulan la unión de los iniciadores de dicho microsatélite, resultando en una reducción o completa pérdida del producto de amplificación (Callen *et al.*, 1993; Schlötterer *et al.*, 2004a). Es importante saber que Ponce (2013), reportó que 7 cultivares procedentes de Junín, dentro de una colección de 168 variedades del Perú (regiones norte, centro y sur), eran proclives a presentar alelos nulos para el marcador STPoAc58. Este resultado puede estar relacionado a un posible número de alelos nulos en la presente investigación, sin embargo por falta de presupuestos y no siendo este un objetivo de la tesis no se determinó si los cultivares de la región Junín presentan o no alta tasa de alelos nulos para este u otros microsatélites. Los microsatélites que reportaron mayor cantidad de alelos perdidos y/o nulos fueron el STPoAc58 y STG0025, coincidiendo el primero con lo señalado por Ponce (2013).

5.4 RIQUEZA Y FRECUENCIAS ALÉLICAS

5.4.1 NÚMERO TOTAL DE ALELOS ENCONTRADOS EN LA COLECCIÓN

Los 21 loci microsatélites mostraron patrones de bandas de buena calidad y alta resolución, permitiendo así la fácil identificación de los alelos (Figura 10). Se obtuvo un total de 158 alelos diferentes (Tabla 8), en 444 cultivares.

El valor es semejante con los encontrados en otros estudios, como por ejemplo: 181 alelos encontradas por de Haan (2009), el cual utilizó 18 SSR en 989 cultivares; 166 encontrados por Soto (2006), el cual utilizó 18 SSR en 79 cultivares y por último 159 bandas encontradas por Braun *et al.* (2004), el cual utilizó 15SSR en 75 cultivares. Sin embargo, estos valores ayudan solo de referencia ya que el número de cultivares analizados no es equivalente, además de tener un origen (Soto, 2006 de Soto; Braun *et al.* 2004) de las colecciones de banco de germoplasma y no de campo. Los cultivares del trabajo de Haan son papas nativas recolectadas *in situ* y es un estudio muy similar al propuesto en el presente trabajo de investigación. Es por tal motivo que comparar estas dos poblaciones permite concluir de manera más cercana a la realidad, sin embargo se espera que la colección evaluada por de Haan sea más diversa debido a que tiene el doble en número de cultivares.

5.4.2 ALELOS ENCONTRADOS

El mayor número de alelos encontrados fue de 13 para el microsatélite STM1052, asimismo el menor número de alelos encontrados fue de 2 para el microsatélite STG0025. El promedio para el número de alelos es de 7.6,

Los valores promedios son semejantes a los valores encontrados en la literatura: 6.8 (Rocha *et al.*, 2010); 8.7 (Soto, 2006); 10.5 (Braun *et al.*, 2004); 10 (de Haan *et al.*, 2010) y 6.8 (Ghislain *et al.*, 2006). El promedio de alelos presenta diferencias debido a la cantidad de microsatélites utilizados, a la capacidad de los microsatélites de discriminar diferentes alelos en las diferentes colecciones evaluadas y a la cantidad de cultivares investigados. Sin embargo hay que tener las consideraciones presentadas anteriormente al momento de comparar trabajos ya que estos difieren en el número de cultivares, cantidad de microsatélites utilizados y regiones de estudio, por lo que estas comparaciones sirven solo de referencia para corroborar la estimación de diversidad.

Se corroboró también que el rango de pesos moleculares para los alelos encontradas no presentan diferencias con los encontrados por Ghislain *et al.*, (2008) para los iniciadores utilizados (ver tabla 6), el cual evaluó 742 cultivares que comprenden todas las utilizadas por Spooner *et al.* (2007), esta colección fue escogida del banco por poseer las accesiones que comprenden todas la especies cultivadas y ser las más polimórficas dentro del banco de germoplasma del CIP. Para todos los microsatélites evaluados el rango encontrado para la zona sur oeste del departamento de Junín es más pequeño que en la colección de referencia, no reportándose ningún nuevo alelo fuera de este rango. Esto es explicado principalmente a que se trata de una colección de menor diversidad y distribución frente a una colección del banco de germoplasma.

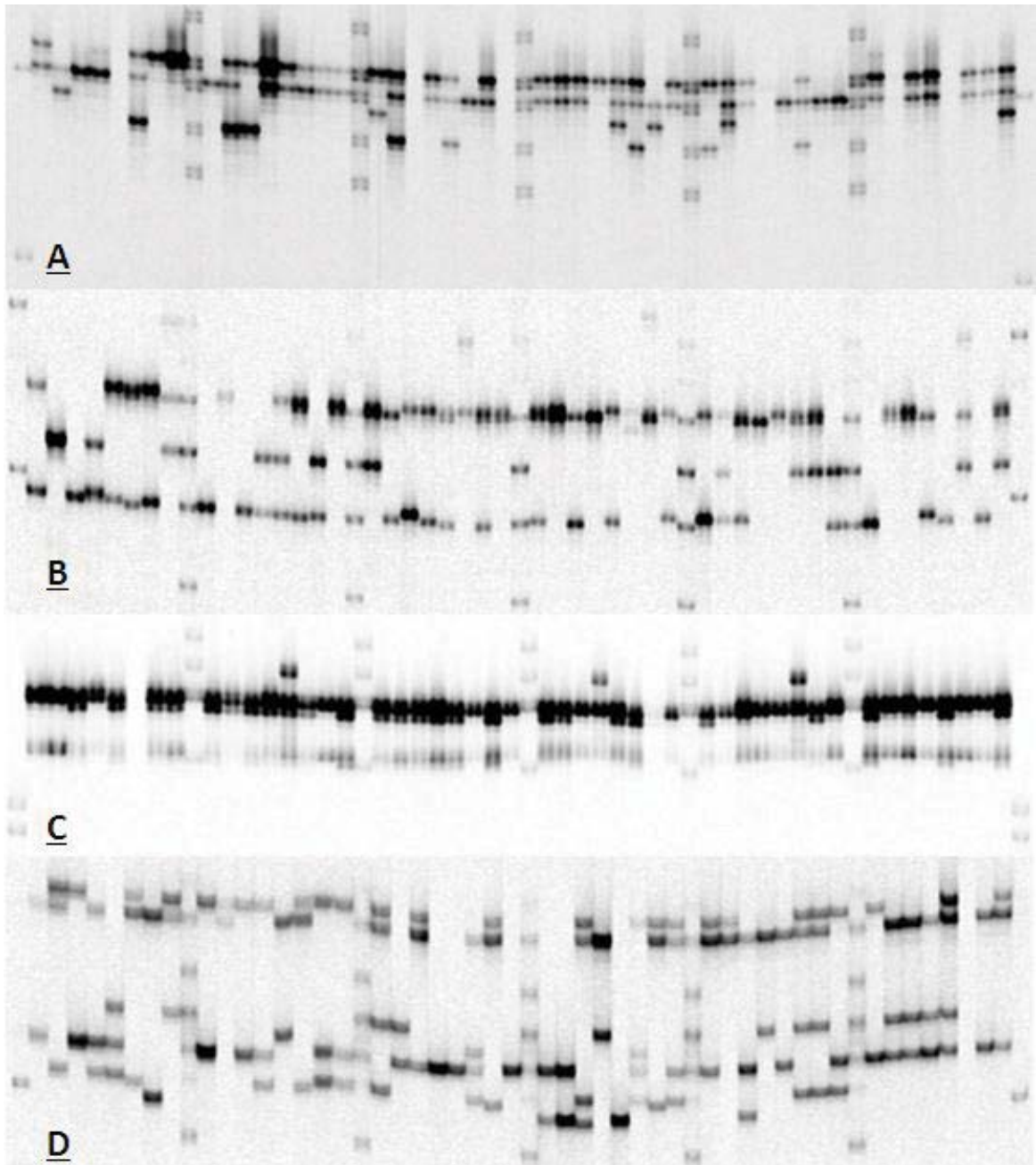


Figura 10. Imágenes de las amplificaciones mostradas en el software Saga Generation. En la figura podemos observar los alelos amplificadas para 4 microsatélites. Los microsatélites mostrados en A y B presentan polimorfismos moderado (STI0014 y STM1052 respectivamente), mientras que C presenta muy poco polimorfismo, llegándose a identificar solo 3 alelos (STG0025). Por el contrario en D observamos a un microsatélites muy polimórfico (STM5127).

5.4.3 CLASIFICACIÓN DE ALELOS POR COMUNIDADES

En la Tabla 8 observamos 4 diferentes tipos de alelos, en base a sus frecuencias de ocurrencia para cada una de las comunidades, éstas son: las que (1) obtuvieron un valor de ocurrencia menor al 1% (alelos raros, $f < 1\%$), (2) menor al 5% (escasos, $1\% < f < 5\%$), (3) menor al 10% (moderados, $5\% < f < 10\%$) (4) e igual o mayor al 10% (frecuentes, $10\% < f$). El 20.3% de 158 alelos, para 444 cultivares, son raros para la totalidad de la colección.

Los valores encontrados son cercanos a los reportados por de Haan (2009), en el cual se encontró el 22.7% como alelos raros de 181 alelos en 989 cultivares evaluados. A pesar de la similitud en los porcentajes, el número de cultivares en la investigación realizada por de Haan (2009), pasa los 900 (como se mencionó previamente), por lo que es probable de que los porcentajes de alelos raros en la zona suroeste de Junín sea de gran importancia para la diversidad de papas. Sin embargo no se han encontrado más publicaciones con estos valores por lo que este valor queda registrado para futuras comparaciones.

Tabla 8. Análisis de la riqueza alélica en las 7 comunidades. En la tabla podemos observar en número de cultivares por comunidad y la frecuencias de alelos raros (R), escasos (E), moderadamente frecuentes (MF) y frecuentes (F). No, indica el número de alelos.

Comunidad	Cultivares (n)	F		MF		ES		R		# Alelos Total	
		No	%	No	%	No	%	No	%	No	%
POMAMANTA	48	78	67.2	13	11.2	25	21.6	0	0.0	116	73.4
RACRACAYA	25	86	73.5	12	10.3	19	16.2	0	0.0	117	74.1
RANGRA	41	83	70.9	15	12.8	19	16.2	0	0.0	117	74.1
QUILLCAS	55	79	61.2	21	16.3	19	14.7	0	0.0	129	81.6
MARCAVALLE	158	82	59.0	17	12.2	27	19.4	13	9.4	139	88.0
MASMA CHICCHE	83	85	69.1	13	10.6	25	20.3	0	0.0	123	77.8
PACA PACCHA	34	88	75.9	17	14.7	11	9.5	0	0.0	116	73.4
TOTAL	444	86	54.4	13	8.2	27	17.1	32	20.3	158	100.0

El número total de alelos es muy similar entre las 7 comunidades en estudio, obteniéndose en promedio 122 alelos. Siendo el número mínimo y máximo de cultivares son 115 y 139, respectivamente. De igual forma podemos observar que la comunidad con mayor número de alelos es Marcavalle, seguida por Quillcas y Masma Chicche.

Es posible que estas tres comunidades mencionadas sean las más diversas dentro de la colección, sin embargo las otras comunidades presentan un número total de alelos elevados y buen porcentaje de estos también se encuentran entre los alelos moderadamente frecuentes y escasos a pesar de la diferencia en el número de cultivares.

5.4.4 ALELOS COMUNES Y ALELOS EXCLUSIVOS

En la Tabla 9 podemos observar el número de alelos comunes y exclusivos compartidos por las 7 comunidades en estudio, presentados para cada uno de los microsatélites utilizados. Asimismo podemos observar en la última columna el número de alelos encontrados para cada marcador microsatélites. Se observa que la mayoría de los alelos son comunes para las 7 comunidades, presentándose un número bajo de alelos exclusivos.

Los alelos comunes se explican por el *pool* genético compartido entre los cultivares. Los alelos exclusivos presentados en la Tabla 9 pertenecen en mayor proporción a la comunidad de Marcavalle, seguido por Quillcas y Masma Chicche, corroborando lo esperado al tener mayor número de alelos (ver Tabla 9). La explicación de estas diferencias, además del mayor número de cultivares para Marcavalle, es por una supuesta base genética más amplia de los cultivares y un *pool* genético característico de cada región. Estas características se ponen en evidencia en la comunidad de Quillcas, que pese a tener la tercera parte del número de cultivares de la comunidad Marcavalle, presenta valores de riqueza alélica elevados. Por otro lado la comunidad de Paca Pacha también presenta un alelo exclusivo para el microsatélite STI0012 (los alelos exclusivo por comunidad se pueden ver en detalle en el ANEXO V).

Tabla 9. Numero de alelos comunes, exclusivos entre comunidades y número de alelos totales para cada uno de los marcadores microsatélites utilizados.

Co. L	Co. D	Alelos comunes	Alelos Exclusivos	Alelos totales
S027	STM1064	3	0	3
S029	STPoAc58	6	1	7
S036	STM1053	4	1	5
S042	STM0037	7	2	9
S052	STM0031	6	1	7
S081	STM1104	9	0	9
S084	STM1052	12	1	13
S101	STM1106	9	2	11
S114	STM5114	4	2	6
S121	STM5121	4	0	4
S127	STM5127	10	2	12
S188	STG0010	3	0	3
S194	STG0016	8	0	8
S203	STG0025	2	0	2
S209	STI0001	5	1	6
S211	STI0004	7	0	7
S214	STI0012	10	2	12
S216	STI0014	6	0	6
S224	STI0030	8	3	11
S225	STI0032	7	3	10
S226	STI0033	5	2	7
Totales		135	23	158

5.4.5 ANÁLISIS DE CULTIVARES CON HAPLOTIPOS COMPARTIDOS

En la Tabla 10 se muestran el número de cultivares que han presentado haplotipos compartidos (cultivares con disimilitud=0), dentro y entre dos comunidades y el número de haplotipos compartidos en la población. Como se puede observar la comunidad de Masma Chicche presenta el mayor número de cultivares compartidos, con 5 comunidades aledañas (Pomamanta, Racracaya, Paca Paccha, Marcavalle y Rangra). Solo Marcavalle y Masma Chicche presentaron haplotipos compartidos entre sus cultivares.

Los porcentajes encontrados son similares a los encontrados por de Haan *et al.* (2010) en su ensayo con 989 cultivares de Huancavelica. El bajo número de haplotipos iguales pone en evidencia que los agricultores no sobreestiman la diversidad con sus sistemas de clasificación (morfológicos y otros) y han logrado mantener durante miles de años diferentes cultivares nativos. Quiros *et al.* (1992), argumenta que las variedades nativas adquieren un sin número de alelos a través del intercambio de semillas entre agricultores, siendo además favorecidas por procesos de climatización y flujo genético que influye en su evolución.

Sin embargo para las comunidades de Paca Paccha, Quillcas, Rangra, Racracaya y Pomamanta el número de haplotipos compartidos puede ser explicado también por el bajo número de cultivares dentro de cada una de las comunidades. De igual forma el porcentaje de datos perdidos (menor al 5%), puede estar influyendo al momento de identificar los haplotipos compartidos. Estas explicaciones deben de ser tomadas en consideración y tratar de reducir las al máximo para establecer de manera certera las causas que afectan una mayor o menor diversidad.

Se encontraron 14 haplotipos compartidos para la población de 444 cultivares, en la Fig. 8 podemos visualizar las posibles vías de intercambio realizadas por los agricultores para el intercambio de cultivares. Se puede observar que la comunidad de Masma Chicche es un centro de intercambio.

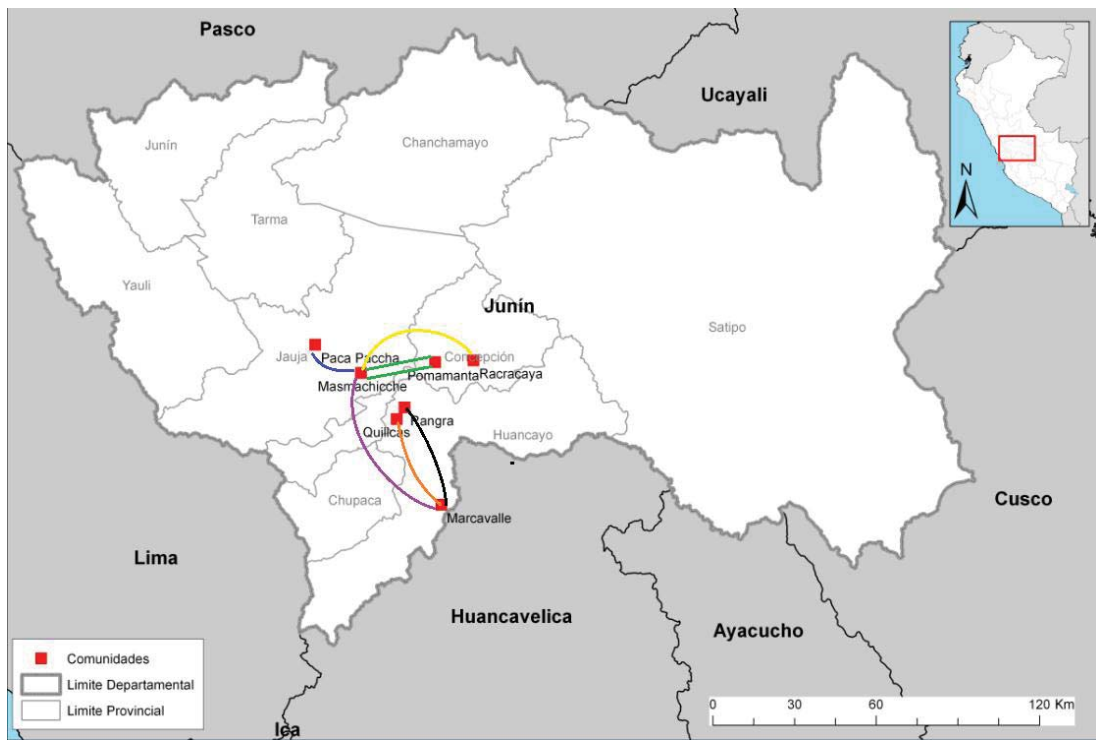


Figura 11. Mapa con las localizaciones de las 7 comunidades evaluadas de la zona suroeste de Junín. Cada una de las líneas se interpreta como un cultivar duplicado entre dos comunidades, no existen haplotipos compartidos en más de 2 comunidades distintas.

Tabla 10. Número de haplotipos compartidos de la colección total y comunidades. Información de número de cultivares por comunidad, riqueza alélica y número de haplotipos compartidos.

Comunidad/Población	# Cultivares	Haplotipos compartidos entre comunidades	Haplotipos compartidos dentro de las comunidades
Marcavalle	158	3	1
Masma Chicche	83	6	5
Racracaya	25	1	0
Paca Paccha	34	1	0
Pomamanta	48	2	0
Rangra	41	2	0
Quillcas	55	1	0
Total	444	*	14

5.4.6 HETEROCIGOSIDAD ESPERADA

Los valores de heterocigocidad esperada por cada comunidad en estudio (tomando el valor promedio de los valores de heterocigocidad por cada microsatélite) varían desde 0.64 a 0.70 (ver Tabla 11). Se tiene así mismo en promedio una H_e esperada de 0.67.

De los valores mostrados se defiende que la diversidad dentro de las comunidades es alta y parecida entre las mismas, sin embargo esto no quiere decir que los cultivares que se encuentran entre las comunidades sean los mismos. Se puede observar además que Racracaya tiene el menor intervalo intercuartil (Figura 12), pero las diferencias son muy pequeñas en comparación con las otras comunidades. Asimismo se puede observar que la mayor mediana se encuentra en la comunidad de Paca Paccha, pero de la misma manera es la que presenta la mayor dispersión de valores para cada SSR.

Se han reportado valores de H_e en *Solanum tuberosum* subsp *andigena* en un rango de 0.492 y 0.5 (Huamán *et al.*, 2000), considerados altos, no obstante hay que tener en cuenta que los valores encontrado de H_e por se basaron en caracterización morfológicas, geográficas y descriptores de enfermedades y pestes; no en caracterizaciones moleculares.

Tabla 11. Valores corregidos de He para comunidades y colección total.

N	SSR	H						
		POMAMANTA	RACRACAYA	RANGRA	QUILLCAS	MARCAVALLE	MASMA CHICCHE	PACA PACCHA
1	STM1064	0.310	0.299	0.391	0.291	0.319	0.268	0.336
2	STPoAc58	0.713	0.798	0.759	0.732	0.725	0.723	0.777
3	STM1053	0.649	0.656	0.649	0.669	0.652	0.665	0.660
4	STM0037	0.673	0.710	0.697	0.713	0.709	0.724	0.749
5	STM0031	0.653	0.675	0.667	0.691	0.614	0.621	0.720
6	STM1104	0.863	0.872	0.835	0.839	0.888	0.902	0.905
7	STM1052	0.775	0.798	0.798	0.808	0.801	0.803	0.813
8	STM1106	0.836	0.861	0.853	0.830	0.829	0.832	0.861
9	STM5114	0.662	0.696	0.685	0.669	0.655	0.684	0.725
10	STM5121	0.690	0.707	0.670	0.626	0.679	0.654	0.615
11	STM5127	0.810	0.864	0.833	0.823	0.821	0.838	0.820
12	STG0010	0.516	0.613	0.594	0.625	0.601	0.562	0.582
13	STG0016	0.731	0.816	0.709	0.692	0.711	0.781	0.746
14	STG0025	0.150	0.342	0.130	0.158	0.205	0.174	0.108
15	STI0001	0.613	0.638	0.653	0.630	0.604	0.632	0.673
16	STI0004	0.526	0.699	0.654	0.672	0.599	0.584	0.701
17	STI0012	0.661	0.636	0.754	0.753	0.679	0.675	0.740
18	STI0014	0.697	0.681	0.685	0.688	0.684	0.655	0.706
19	STI0030	0.739	0.840	0.769	0.817	0.796	0.788	0.827
20	STI0032	0.742	0.743	0.693	0.746	0.718	0.718	0.751
21	STI0033	0.212	0.303	0.239	0.308	0.258	0.321	0.472
	He Prom	0.64	0.70	0.67	0.67	0.66	0.67	0.70

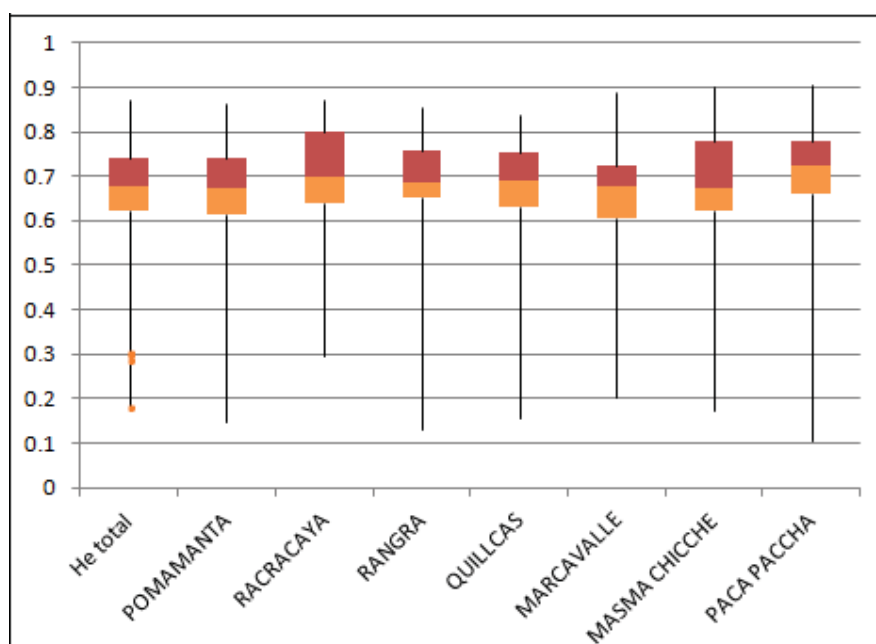


Figura 12. Diagrama de Cajas (Box Plot) de la heterocigosidad total y de comunidades.

5.5 ANÁLISIS DE VARIANZA MOLECULAR

Como podemos observar en la Tabla 12 al agrupar las papas nativas por comunidades campesinas se obtuvo que la principal fuente de variación genética (98.1%) se debe a las diferencias dentro de las comunidades.

Los valores encontrados permiten pensar que no existe una estructura genética poblacional diferenciada entre las comunidades, teniendo cada una de estas cultivares distintos y conservados. Los resultados obtenidos se respaldan en los encontrados por de Haan *et al.* (2010) y Ponce (2013), donde las principales diferencias de variación se encontraron dentro de las poblaciones de estudio y no entre ellas.

Tabla 12. Análisis AMOVA para las siete comunidades (Índice de fijación (Fst)= 0.019).

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Componentes de varianza	Porcentaje de variación
Entre comunidades de la colección	6	200.44	0.30	1.9
Entre individuos dentro de las comunidades	437	6826.01	15.62	98.1
Total	443	7026.46	15.92	

5.6 ANÁLISIS DE AGRUPAMIENTO

Se graficó el árbol de disimilaridad a partir de la agrupación encontrada mediante el método UPGMA. A pesar de haber escogido solo 444 cultivares para el análisis de diversidad, con un máximo de 5% de datos perdidos por cultivar, también se dibujó con el 10% de datos perdidos por cultivar (489 cultivares). Se dibujaron los dos árboles con el objetivo de comparar las posibles diferencias entre los árboles que pudieran surgir por un incremento del porcentaje de datos perdidos en las distintas accesiones. Así podemos observar los dos árboles en la Figura 13 (A y B), su distribución y forma general presentan muchas semejanza (los datos se agrupan por colores correspondientes a la ploidía de cada uno de los cultivares),

Sin embargo se pueden observar pequeñas diferencias en el agrupamiento de algunas accesiones. Al eliminar cultivares con porcentaje de datos perdidos podemos observar que el grupo señalado con una flecha roja en la Figura 13 se moviliza fuera del gran grupo de diploides y forma un nuevo grupo con una mayor jerarquía. Esto ocurrió debido a que las accesiones eliminadas tenían alta similitud con estos cultivares (sin embargo esta similitud era obtenida por su alto contenido de datos perdidos), por tal motivo al colocarlas juntas se agrupaban de diferente manera y no podían mostrar su real diferencia frente a los demás cultivares.

En un análisis más detallado se observan diferentes agrupaciones puntuales de algunos cultivares comprobando que es mejor tener datos con el menor número de datos perdidos por accesión ya que nos pueden llevar a generar conclusiones equivocadas. Es importante e ideal tener todos los cultivares sin datos perdidos pero en la práctica a veces se dificulta por distintos problemas, como la extracción, amplificación, especie, contaminación, etc. La principal elección de los 444 cultivares se llevó a cabo después de ver estos dos árboles ya que como se mencionó anteriormente el árbol de 444 es más robusto estadísticamente y más cercano a lo real. Es importante de todas maneras completar estos datos faltantes y estudiar las diferencias que se podrían encontrar.

Analizando el árbol radial de la Figura 14 podemos visualizar que los cultivares no forman grupos distintivos, por el contrario los cultivares se encuentran totalmente dispersas, sin orden y diferentes entre sí alrededor del árbol.

Las agrupaciones de los cultivares corroboran los resultados de heterocigocidad y AMOVA, donde se muestra que cada comunidad presenta altas diversidades y los cultivares se son diferentes entre sí. Estas conclusiones también permiten visualizar la alta diversidad presente en la región suroeste de la región Junín.

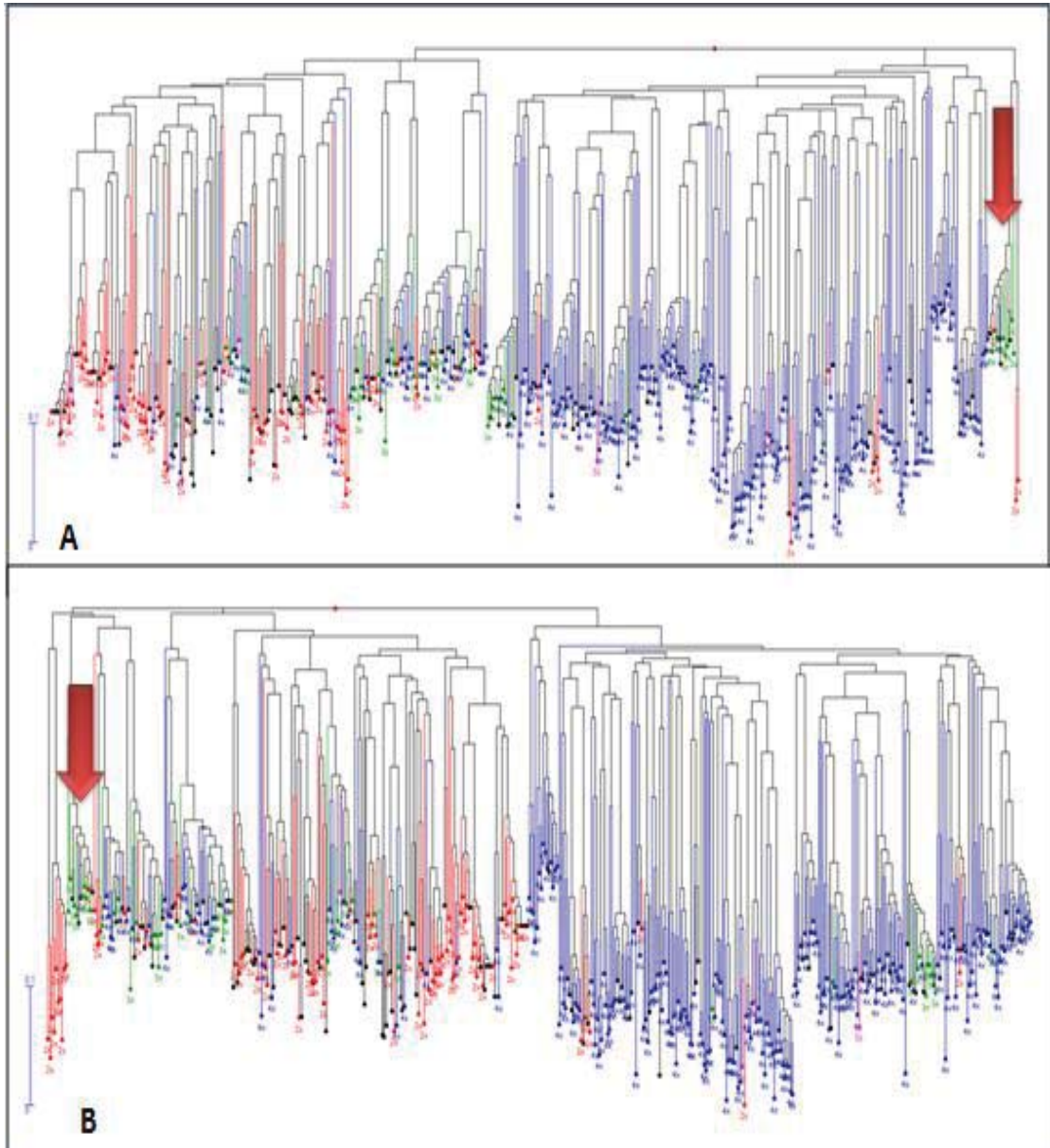


Figura 13. Dendogramas de la población suroeste de Junín, con diferentes número de cultivares. Árboles construidos con agrupamiento UPGMA con DARwin 5.0.1 (coeficiente de Jaccard) En A podemos observar el árbol jerárquico para 444 cultivares (cultivares con un máximo de 5% de datos perdidos) y en B observamos el árbol jerárquico para 489 cultivares (cultivares con un máximo de 10% de datos perdidos). Para A y B se ven en azul los cultivares tetraploides, en verde los cultivares triploides, en rojo los cultivares diploides y en negro los cultivares sin determinación de ploidia.

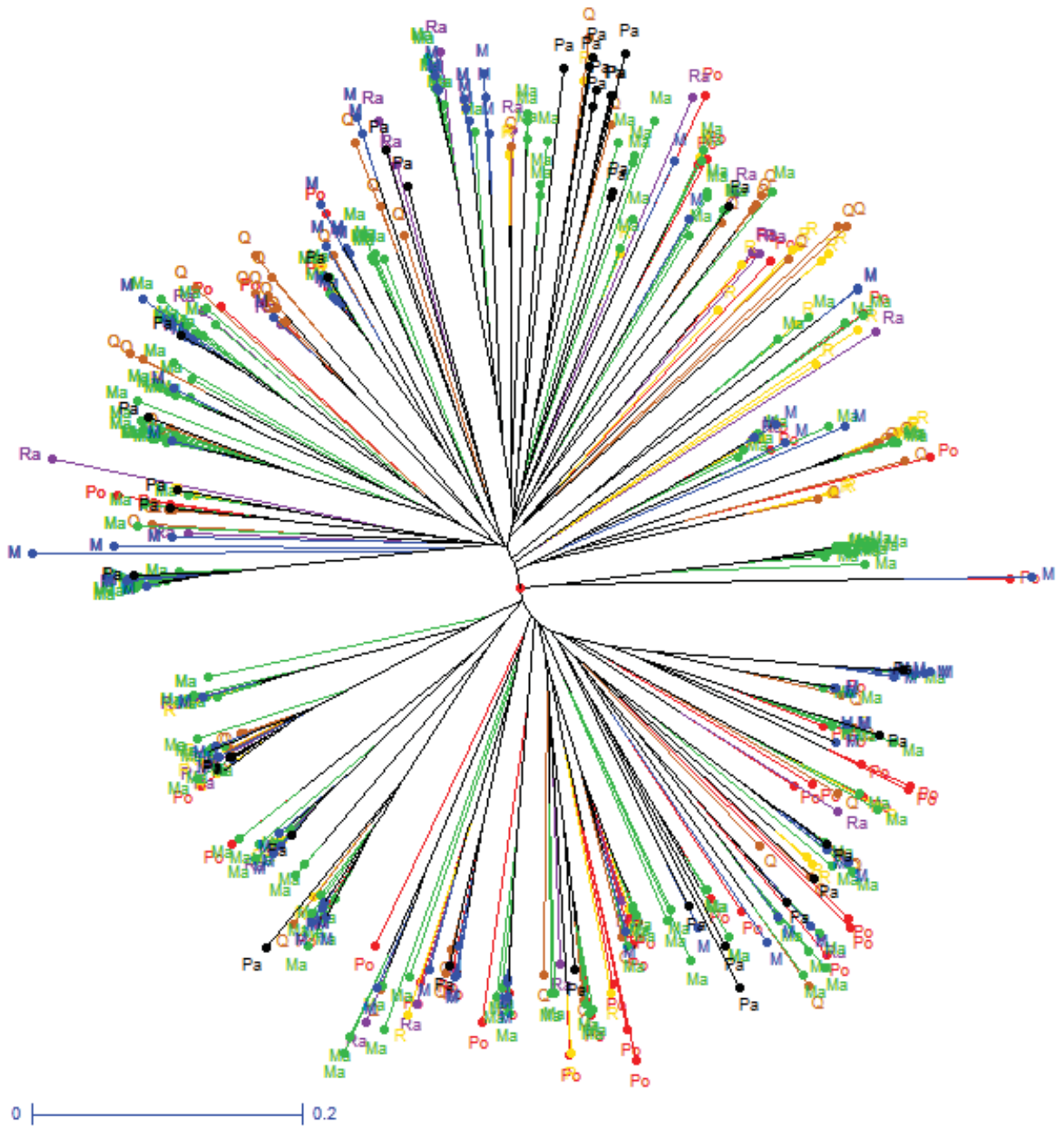


Figura 14. **Árbol radial de la zona suroeste del departamento de Junín.** Dendrograma construido con agrupamiento UPGMA (coeficiente de Jaccard). Los diferentes colores representan a las 7 comunidades: Rojo, Pomamanta(Po); Morado, Racracaya(Ra); Amarillo, Rangra(R); Marron, Quillcas (Q); Verde, Marcavalle(Ma); Azul, Masma Chicche(M) y Negro, Paca Paccha (Pa).

VI. CONCLUSIONES

- Los altos valores de riqueza alélica, heterocigocidad y agrupamientos encontrado permiten inferir que los cultivares evaluados para la región suroeste del departamento de Junín son diversos.
- Los cultivares con haplotipos compartidos encontrados, permite concluir que el intercambio de cultivares no es frecuente entre las comunidades, esta información complementa a los altos valores de diversidad encontrados en la población.
- El AMOVA reveló que no existe estructura genética poblacional diferenciada entre las comunidades.

VII. RECOMENDACIONES

- Monitorear en los próximos años este microcentro de diversidad de papas nativas en búsqueda de posibles erosiones genéticas, producidas por el cambio climático, procesos evolutivos y/o participación directa del hombre.
- Es vital reconocer el conocimiento andino de los agricultores (clasificación morfológica) al momento de clasificar los diversos cultivares ya que, al comparar con datos científicos, estos conocimientos pasados de generación en generación resultan ser precisos. Es así como se recomienda no perder la comunicación e interacción con los actores de la variabilidad genética y guardianes de la diversidad. *“En esencia, los sistemas usados por los agricultores, son el corazón que impulsa a la conservación de sus alimentos”* (e Haan, 2009).
- Es importante analizar nuevos cultivares de la región suroeste del departamento de Junín, adicionando nuevas comunidades de estudio. Se sugiere para esto, conseguir un número de cultivares altos por cada comunidad para poder comparar la diversidad entre comunidades de manera precisa y confiable ($n > 50$).
- Es importante comparar la diversidad encontrada en Junín versus otras regiones del Perú para evaluar su variabilidad frente a otras poblaciones de semejante magnitud.
- Repetir las amplificaciones de aquellos cultivares con alto contenido de datos perdidos. Repetir de esta manera las cuantificaciones de ADN y pruebas de calidad, comprobando la existencia de ADN disponible.
- Establecer un sistema de controles positivos y negativos para corroborar la presencia de alelos nulos, de igual manera promover la extracción doble o triple de ADN para evitar errores de interpretación de alelos nulos por mala calidad de ADN.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLEN, A. AND SAVAGE, V. 2007. Setting the absolute tempo of biodiversity dynamics. National Center for Ecological Analysis and Synthesis. Department of System Biology Harvard Medical School. Ecology Letters (2007) 10: 637-646.

AVISE, J.C. 2004. Molecular Markers, Natural History and Evolution. 2d Ed. Sunderland, Massachusetts, Sinauer Associates, v.64, p.684.

BAENA, M., JARAMILLO, S., MONTOYA, JE. 2003. Conservacion In Situ de la Diversidad Vegetal en Areas Protegidas y en Fincas. Ed. IPGRI. Cali-Colombia, s.e.

BRACK, A. 1983. El ambiente en que vivimos. Editorial Salesiana. Lima, Peru.

BRAUN, A., SCHULLEHNER, K., WENZEL, G. 2004. Molecular analysis of genetic variation in potato (*Solanum tuberosum* L). International cultivar spectrum. Potato Research 47: 93-99.

BRUSH, S. 1991. A farmer-based approach to conserving crop germplasm. Economic Botany 45(2): 153-165.

BUKASOV, S. 1971. Systematics of the potato (In Russian). English translation of article first appearing in Trudy Prikl Bot 62:345. In: Kothetar, V.S. (ed.), Systematics, Breeding, and Seed Pro-duction of Potatoes. Amerind Publishing Co., New Delhi, India. pp. 1-42.

CALLEN, D., THOMPSON, A., SHEN, Y., PHILLIPS, H., RICHARDS, R., MULLEY, J., AND SUTHERLAND, G. 1993. Incidence and origin of “null” alleles in the (AC)n microsatellite markers. American journal of human genetics. 52(5), 922–7.

CBD. 2006. La Diversidad Biológica en las evaluaciones de impacto. Documento de antecedentes de la decisión VII/28 del Convenio sobre la Diversidad Biológica: Directrices

voluntarias sobre evaluaciones de impacto, incluida la diversidad Biológica. Cuaderno Técnico CDB No. 26.

CBD. 2011. Protocolo de Nagoya sobre acceso a los recursos genéticos y participación justa y equitativa en los beneficios que se deriven de su utilización. Secretaria del convenio sobre la diversidad Biológica.

COCKERHAM, C. 1969. Variance of gene frequencies. *Evolution*, 1969(23): 72-83.

COCKERHAM, C. 1973. Analysis of gene frequencies. *Genetics*, 1973 (74): 679-700

CONDORI ROSALES, JM. 2003. Selección de la colección núcleo de *Solanum tuberosum* subsp. *andigena* basada en marcadores microsatélites.s.1., UNALM.

CRIB P. AND HAWKES J. 1986. Experimental evidence for the origin of *Solanum tuberosum* subsp. *andigena*. D'Arcy WG (Ed). "Solanaceae: biology and systematics. 2. International Symposium on the biology and systematics of the solanaceae. Missouri (USA). Columbia University Press, new York, EEUU. Pp 383 – 404.

CUADRA, D. 2012. El camino a una distribución justa y equitativa de los beneficios derivados del uso de los recursos genéticos (ABS) en el Perú. 2012: 2010-2012.

DE HAAN, S., NÚÑEZ, J., BORNIERBALE, M., GHISLAIN, M., VAN DER MAESEN, J. 2013. A simple sequence repeat (SSR) marker comparison of a large in- and es-situ potato landrace cultivar collection from Peru reaffirms the complementary nature of both conservation strategies. *Diversity* 5(3): 505-521.

DE HAAN, S. 2009. Potato diversity at height: multiple dimensions of farmer-driven in-situ conservation in the Andes. Pags. 245 pp. Lima, Wageningen University.

DE HAAN, S., NÚÑEZ, J., BORNIERBALE, M., GHISLAIN, M. 2010. Multilevel agrobiodiversity and conservation of andean potatoes in central Peru. *Mountain Research and Development* 30(3): 222-231.

DEL RIO, A., BAMBERG, J., HUAMÁN, Z. 1997. Assessing changes in the genetic diversity of potato gene banks. *Theory and applied genetics* 95: 199-204.

DODDS, K. 1962. Classification of cultivated potatoes. In D. S. Correll (ed.), *The potato and its wild relatives*. Contributions from Texas Research Foundation, *Botanical Studies* 4: 517-539.

DOYLE, J.J. AND DOYLE, J.L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 13-15.

EISEN, J. 1999. Mechanistic basis for microsatellite instability. In: *Microsatellites: Evolution and Applications*. Oxford University Press, Oxford, UK, pp. 34–48.

ELSHIRE, R., GLAUBITZ, J., SUN, Q., POLAND, J., KAWAMOTO, K., BUCKLER, E., MITCHELL, S. 2011. A robust, simple genotyping-by-sequencing (GBS) approach for high diversity species. *PloS one* 6(5):e19379.

ESA. 2010. *BIODIVERSITY AND PLANT BREEDING*. Luxemburgo, 8pp.

EXCOFFIER, L., SMOUSE, P. AND QUATTRO, J. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131:479- 491.

EXCOFFIER L., LAVAL, G. AND SCHNEIDER, S. 2005. Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. *Evol. Bioinform. Online* 1: 47-50.

FAO. 1996. *Conservación y utilización sostenible de los recursos fitogenéticos para la alimentación y la agricultura: plan de acción mundial e informe sobre el estado de los recursos fitogenéticos en el mundo*. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Roma, Italia.

FAO. 2009. *Año internacional de la papa 2008: nueva luz sobre un Tesoro enterrado*. Organización de las naciones unidas para la agricultura y la alimentación. Roma. 2009.

FAO. 2010. The second report on the state of the world's plant genetic resources for food and agriculture. Rome, 372 pp.

FAO. 2012. Segundo plan de acción mundial para los recursos fitogenéticos para la alimentación y la agricultura. Comisión de recursos genéticos para la alimentación y la agricultura. Roma, Italia, FAO 00153.

FAOSTAT. 2013. Statistics Division. Food and Agriculture Organization. <http://faostat.fao.org>. Florida, USA.

FERREIRA, M. Y GRATTAPAGLIA, D. 1998. Introducción al uso de marcadores moleculares en el análisis genético. 1ed. EMBRAPA-CENARGEN. Brasilia, DF. pag: 55-62, 121-139.

FRANCIS, C. 1985. Variety development for multiple cropping systems. CRC Critical Reviews in Plant Sciences 3:133-168.

FRY, E., GOODWIN, S., DYER, A., MATUSZAK, J., DRENTH, A., TOOLEY, P., SUJKOWSKI, L. KOH, Y., COHEN, B., SPIELMAN J., DEAHL K., INGLIS, D., AND SANDLAN K. 1993. Historical and recent migrations of *Phytophthora infestans*: chronology, pathways, and implications. *Plant Disease* 77(7): 653-661.

GHISLAIN, M., ANDRADE, D., RODRÍGUEZ, F., HIJMANS, R., SPOONER, D. 2006. Genetic analysis of the cultivated potato *Solanum tuberosum* L. Phureja Group using RAPDs and nuclear SSRs. TAG, Theoretical and applied genetics. *Theoretische und angewandte Genetik* 113(8): 1515-27.

GHISLAIN, M., NÚÑEZ, J., HERRERA, M., PIGNATARO, J., GUZMAN, F., BORNIERBALE, M., SPOONER, D. 2008. Robust and highly informative microsatellite-based genetic identity kit for potato. *Molecular Breeding* 23(3): 377-388.

GHISLAIN, M., RODRÍGUEZ, F., VILLAMÓN, F. 1999. Establishment of microsatellite assays for potato genetic identification. *CIP* 1999:167-174.

HARTL, D. AND JONES, E. 2009. Genetics: Analysis of Genes and Genomes. Jones and 7th Ed. Bartler Publishers, Canada.

HAMADA H., PETRINO M., KAKUNAGA, T. 1982. A novel repeated element with Z-DNA-forming potential is widely found in evolutionarily diverse eukaryotic genomes. Proc Natl Acad Sci 79: 6465-6469.

HAWKES, J. 1956. Taxonomic studies on the tuber-bearing *Solanums*. I. *Solanum tuberosum* and the tetraploid species complex. Proc. Linn. Soc., 166, 97-144.

HAWKES, J. 1990. The Potato: Evolution, Biodiversity and Genetic Resources. Belhaven Press, Washington, DC.

HAWKES, J. 1994. Origins of cultivated potatoes and species relationships. pp. 3-42. In: J.E. Bradshaw and G.R. Mackay (eds.), Potato Genetics. Centre for Agriculture and Biosciences International, Wallingford.

HERRERA, M., GHISLAIN, M. 2000. Molecular biology laboratory protocols plant genotyping training manual. Centro Internacional de la papa.

HIJMANS, R., SPOONER, D., SALAS, A., GUARINO, L. Y DE LA CRUZ, J. 2002. Atlas of wild potatoes. Systematic and Ecogeographic Studies of Crop Genepools, 10. International Plant Genetic Resources Institute, Rome.

HUAMAN, Z., HAWKES, J. AND ROWE, P. 1982. A biosystematic study of the origin of the diploid potato, *Solanum ajanhuiri*. Euphytica 31: 665-675.

HUAMAN, Z. 1995. Técnicas citológicas para determinar el número cromosómico y la fertilidad de las papas. Guía de investigación. CIP Circular. 10: 30.

HUAMÁN,Z., ORTIZ, R. AND GÓMEZ, R. 2000. Selecting a *Solanum tuberosum* subsp. *andigena* core collection using morphological, geographical, disease and pest descriptors. Am J Potato Res 77:183–190

HUAMAN, Z., SPOONER, D. 2002. Reclassification of landrace populations of cultivated potatoes (*Solanum* sect. *Petota*). *American Journal of Botany* 89(6): 947-965.

HUFF, D., PEAKALL, R. AND SMOUSE, P. 1993. RAPD variation within and among natural populations of outcrossing buffalograss [*Buchloe dactyloides* (Nutt.) Engelm]. *Theor. Appl. Genet.* 1993, 86: 927-934.

INEI. 2011. Junin: Compendio Estadístico 2011. Oficina Departamental de Estadística e Informática de Junín. www.inei.gob.pe.

KARP, A., KRESOVICH, S., BHAT, K., AYAD, W., HODGKIN, T. 1997. Molecular tools in plant genetic resources conservation: a guide to the technologies. Rome, Italy, IPGRI.

LECHNOVICH, V. 1971. Cultivated potato species. In S.M. Bukasov (ed.), *Flora of Cultivated Plants Vol. IX: Potato*, 41-302. Publishing House Kolos, Leningrad, Russia.

LI, Y., KOROL, A., FAHIMA, T., BEILES, A. AND NEVO, E. 2002. Microsatellites: genomic distribution, putative functions, and mutational mechanisms: a review. *Mol. Ecol.*, 11, 2453–2465.

LI-COR. 2003. Operator's Manual: NEN Model 4300 DNA Analyzer. Lincoln, Nebraska USA68504.

LIU, K., GOODMAN, M., MUSE, S., SMITH, J. S., BUCKLER, E., AND DOEBLEY, J. 2003. Genetic structure and diversity among maize inbred lines as inferred from DNA microsatellites. *Genetics*, 2003. 165(4), 2117–28.

MARTINEZ, I. 1993. Conservación de recursos fitogenéticos.

MATSUBAYASHI, M. 1991. Phylogenetic relationships in the potato and its related species. p.93–118. In T. Tsuchiya and P.K. Gupta (ed.). *Chromosome engineering in plants: Genetics, breeding, evolution*, part B. Elsevier, Amsterdam.

MENGONI A., GORI A. AND BAZZICALUPO M. 2000. The use of RAPD and SSR (microsatellite) variation for assessing genetic relationships among tetraploid alfalfa. *Plant Breeding*, 2000. 119: 311-318.

MINAG. 2003. Plan estratégico de la cadena de la papa. Lima, Peru. 2003:45.

NEI, M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 70:3321-3323.

NEI, M. 1987. *Molecular evolutionary genetics*. Columbia University Press, New York.

O'BRIEN, S. 1994. A role for molecular genetics in biological conservation. *Laboratory of viral carcinogenesis*. National Cancer Institute. Vol. 91, pp. 5748-5755.

OCHOA, C. 1990. *The Potatoes of South America- Bolivia*. Cambridge University Press, New York.

OCHOA, C. 1999. *Las papas de Sudamérica: Perú (Parte I)*. International Potato Center, Lima, Peru.

OVCHINNIKOVA, A., KRYLOVA, E., GAVRILENKO, T., SMEJALOVA, T., ZHUK, M., KNAPP, S., SPOONER, D. 2011. Taxonomy of cultivated potatoes (*Solanum* section *Petota*: Solanaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* 165(2): 107-155.

PAFFETTI D., DAGUIN F., FANCELLI S., GNOCCHI S., LIPPI F., SCOTTI C., BAZZICALUPO M. 1998. Influence of plant genotype on the selection of nodulating *Sinorhizobium meliloti* strains by *Medicago sativa*. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 1998, 73: 3-8.

PERRIER, X., JACQUEMOUD-COLLET, J. (2006) DARwin software. <http://darwin.cirad.fr/Darwin>.

PISTORIUS, R. 1997. *Scientists, plants and politics: a history of the plant genetic resources movement*. Rome, Italy, IPGRI.

PONCE, R. 2013. Caracterización molecular de las variedades de papas cultivadas (*Solanum* spp.) más importantes del Perú mediante el uso de marcadores microsatélites. Tesis para optar al Título Profesional de Biólogo Genetista Biotecnólogo. Facultad de Ciencias Biológicas, UNMSM. Lima, Perú.

PUSADEE, T., JAMJOD, S., CHIANG, Y., RERKASEM, B., Y SCHAAL, B. A. 2009. Genetic structure and isolation by distance in a landrace of Thai rice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 106(33), 13880–5.

QUIROS, C., ORTEGA R., VAN RAARNSDONK, L., HERRERA-MONTOYA M., CISNEROS, P., SCHMIDT, E. AND BRUSH, S. 1992. Increase of potato genetic resources in their center of diversity: The role of natural outcrossing and selection by the Andean farmer. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 39: 107-113.

ROCHA, E., PAIVA, L., CARVALHO, H. DE GUIMARÃES, C. 2010. Molecular characterization and genetic diversity of potato cultivars using SSR and RAPD markers. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 10:204-210.

ROHFL, F. 1992. NTSYS-pc. Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System. Exeter Software, Setauket, NY.

ROJAS, D. 2012. Diversidad genética y estructura poblacional en genotipos diploides de papa. Universidad Nacional de Colombia.

SAHU, B., SUMIT, R., SRIVASTAVA, S., BHATTACHARYYA, M. 2012. Sequence based polymorphic (SBP) marker technology for targeted genomic regions: its application in generating molecular map of the *Arabidopsis thaliana* genome. *BMC genomics* 13(1):20.

SAITOU, N. AND NEI, M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.*, 4, 406–425.

SALAMAN, R. 1937. The potato in its early home and its introduction into Europe. *J R Hort Soc* 62:61–67, 112–113, 156–162, 253–266.

SCHLÖTTERER, C. 2000. Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. *Chromosoma* 109(6) 365-371.

SCHLÖTTERER, C., KAUER, M., DIERINGER, D. 2004a. Allele excess at neutrally evolving microsatellites and the implications for tests of neutrality. *Biological sciences. The Royal Society* 271(1541):869-74.

SCHLÖTTERER, C. 2004b. The evolution of molecular markers-just a matter of fashion? *Nature reviews. Genetics* 5(1):63-9.

SEGUEL, I. 2001. Conservación de recursos fitogénéticos Ex situ. Chile, 12 pp.

SELKOE, K., TOONEN, R. 2006. Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecology letters* 9(5): 615-29.

SMARTT J. AND SIMMONDS N. 1995. Evolution of crop plants. Longman Scientific and Technical, Essex, UK.

SMITH, J., CHIN, E., SHU, H., SMITH, O., WALL, S., SENIOR, M., MITCHELL, S., KRESOVICH, S. AND ZIEGLE, J. 1997. An evaluation of the utility of SSR loci as molecular markers in maize (*Zea mays* L.), comparison with data from RFLPs and pedigree. *Theoretical Applied Genetics* 95: 163-173.

SOTO, J. 2006. Análisis de la diversidad genética de papa nativa (*Solanum* spp.) de los departamentos de Ayacucho, Cajamarca, Cuzco, Huancavelica y Puno – Perú, mediante el uso de marcadores moleculares microsatélites, Pags, 78 oo. s.l., UNMSM.

SPOONER, D., HIJMANS, R. 2001. Potato systematics and germplasm collecting, 1989-2000. *American Journal of Potato Research* 2001: 237-268.

SPOONER, D., NÚÑEZ, J., TRUJILLO, G., HERRERA M., GUZMÁN, F., GHISLAIN, M. 2007. Extensive simple sequence repeat genotyping of potato landraces supports a

major reevaluation of their gene pool structure and classification. Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America 104 (49):19395-403.

SPOONER, D., VAN TREUREN, R., DE VICENTE, M. 2005. Molecular markers for genebank management.

TABERLET, P., WAITS, L., LUIKART, G. 1999, Noninvasive genetic sampling: look before you leap. Trends in Ecology & Evolution 14:323-327.

UGENT, D. 1966. Hybrid weed complexes in *Solanum*, Section Tuberarium. PhD dissertation, University of Wisconsin, Madison.

UITDEWILLIGEN, J. 2012. Discovery and genotyping of existing and induced DNA sequence variation in potato.

UPADHYAYA, H., GOWDA, C., SASTRY, D. 2008. Plant genetic resources management: collection, characterization, conservation and utilization, Journal of SAT Agricultural Research 6(December): 1-16.

VAN DEN BERG R., MILLER J., UGARTE M., KARDOLUS J., VILLAND J., NIENHUIS J., SPOONER D. 1998. Collapse of morphological species in the wild potato *Solanum brevicaulis* complex (Solanaceae: sect. Petota). Am J Bot 85:92-109.

VÁSQUEZ, V. 1988. Mejoramiento Genético de la papa. Primera edición Amaru-CONCYTEC. Lima-Perú

VREUGDENHIL, D., BRADSHAW, J., GEBHARDT, C., GOVERS, F., MACKERRON, D.K.L., TAYLOR, M. & ROSS, H. 2007. Potato biology and biotechnology advance and perspectives. First edition, Elsevier editorial, London.

ZUMBA, M. 2008. Caracterización morfo-agronómica y etnobotánica de 49 papas nativas ecuatorianas de Cotopaxi. Tesis, Universidad de Cotopaxi, Facultad de Agronomía. Latacunga, Ecuador. 67 p.

IX. ANEXOS

ANEXO I - Características de microsatélites del PGI-Kit

Nombre del Primer	SECUENCIAS	T°annealing (C°)	Motivo repetido
STG0001F	CAC GAC GTT GTA AAA CGA CCAGCCAACATTTGTACCCCT	58	(CT)n
STG0001R	ACCCCCACTTGCCATATTTT		
STG0010F	CAC GAC GTT GTA AAA CGA CCGATCTCTGCTTTGCAGGTA	58	(TG)n
STG0010R	GTTCACTACTACCGCCGACT		
STG0016F	CAC GAC GTT GTA AAA CGA CAGCTGCTCAGCATCAAGAGA	55	(AGA)n
STG0016R	ACCACCTCAGGCACTTCATC		
STG0025F	CAC GAC GTT GTA AAA CGA CTGGAATCCGAATTACGCTCT	56	(AAAC)n
STG0025R	AGGTTTTACCACTCGGGCTT		
STI0001F	CAC GAC GTT GTA AAA CGA CCAGCAAAATCAGAACCCGAT	60	(AAT)n
STI0001R	GGATCAGCAAATTCACCGCT		
STI0003F	CAC GAC GTT GTA AAA CGA CACCATCCACCATGTCAATGC	60	(ACC)n
STI0003R	CTCATGGATGGTGTTCATTGG		
STI0004F	CAC GAC GTT GTA AAA CGA CGCTGCTAAACTCAAGCAGAA	60	(AAG)n
STI0004R	CAACTACAAGATTCATCCACAG		
STI0012F	CAC GAC GTT GTA AAA CGA CGAAGCGACTTCCAAAATCAGA	56	(ATT)n
STI0012R	AAAGGGAGGAATAGAAACCAAAA		
STI0014F	CAC GAC GTT GTA AAA CGA CAGAACTGAGTTGTGTTGGGA	54	(TGG)n (AGG)n
STI0014R	TCAACAGTCTCAGAAAACCTCT		
STI0030F	CAC GAC GTT GTA AAA CGA CTTGACCCTCCAATATAGATTCTTC	58	(ATT)n
STI0030R	TGACAACTTTAAAGCATATGTCAGC		
STI0032F	CAC GAC GTT GTA AAA CGA CTGGGAAGAATCCTGAAATGG	61	(GGA)n
STI0032R	TGCTCTACCAATTAACGGCA		
STI0033F	CAC GAC GTT GTA AAA CGA CTGAGGGTTTTAGAAAAGGGA	61	(AGG)n
STI0033R	CATCCTTGCAACAACCTCCT		

Nombre del Primer	SECUENCIAS	T°annealing (C°)	Motivo repetido
STM0031F	CAC GAC GTT GTA AAA CGA CCATACGCACGCACGTACAC	56	(AC)n...(AC)n CGAC(AC)n (GCAC)n
STM0031R	TTCAACCTATCATTTTGTGAGTCG		
STM0037F	CAC GAC GTT GTA AAA CGA CAATTTAACTTAGAAGATTAGTCTC	48	(TC)n (AC)n AA(AC)n (AT)n
STM0037R	ATTTGGTTGGGTATGATA		
STM1052F	CAC GAC GTT GTA AAA CGA CCAATTTTCGTTTTTTCATGTGACAC	50	(AT)n GT(AT)n (GT)n
STM1052R	ATGGCGTAATTTGATTTAATACGTAA		
STM1053F	CAC GAC GTT GTA AAA CGA CTCTCCCCATCTTAATGTTTC	52	(TA)n(ATC)n
STM1053R	CAACACAGCATAACAGATCATC		
STM1064F	CAC GAC GTT GTA AAA CGA CGTTCTTTTGGTGGTTTTCT	52	(TA)n(TG)n GT (TG)n
STM1064R	TTATTTCTCTGTTGTTGCTG		
STM1104F	CAC GAC GTT GTA AAA CGA CTGATTCTCTTGCTACTGTAATCG	55	(TCT)n
STM1104R	CAAAGTGGTGTGAAGCTGTGA		
STM1106F	CAC GAC GTT GTA AAA CGA CTCCAGCTGATTGGTTAGGTTG	49	(ATT)n
STM1106R	ATGCGAATCTACTCGTCATGG		
STM5114F	CAC GAC GTT GTA AAA CGA CAATGGCTCTCTGTATGCT	60	(ACC)n
STM5114R	GCTGTCCCAACTATCTTTGA		
STM5121F	CAC GAC GTT GTA AAA CGA CCACCGGAATAAGCGGATCT	50	(TGT)n
STM5121R	TCTTCCTTCCATTTGCA		
STM5127F	CAC GAC GTT GTA AAA CGA CTTCAAGAATAGGCAAAACCA	52	(TCT)n
STM5127R	CTTTTCTGACTGAGTTGCCTC		
STPoAc58F	CAC GAC GTT GTA AAA CGA CTTGATGAAAGGAATGCAGCTTGTG	57	(TA)n
STPoAc58R	ACGTTAAAGAAGTGAGAGTACGAC		

ANEXO II - Extracción de ADN

Se utilizó tejido foliar joven de cada una de las papas nativas para la extracción de ADN. El procedimiento se realizara según el protocolo de Doyle & Doyle (1990), modificado a pequeña escala, se muestran los pasos a continuación:

- 1) Cortar y colocar hojas (0.20 – 0.22 g.) en tubos eppendorf esterilizados de 2mL de capacidad. Luego colocar esferas de cerámica esterilizadas dentro de los tubos. .
- 2) Resuspender con 750 μ L de buffer de extracción CTAB 2X (Bromuro de hexadeciltrimetil amonio) y 2 μ L de β -mercaptoetanol.
- 3) Triturar las muestras en el equipo Fastprep-24 dos veces, durante intervalos de 20 segundos.
- 4) Incubar las muestras trituradas 65°C por 45 minutos, agitar los tubos en intervalos de 5 minutos por lo menos 3 veces y luego 2 veces cada 20 minutos. Retirar las muestras de la incubadora y dejar enfriar a temperatura ambiente.
- 5) Para la separación de proteínas y polisacáridos se agrega 750uL de cloroformo:Alcohol Isoamilico (24:1) y agita ligeramente hasta homogenizar el contenido.
- 6) Centrifugar a 14 000 rpm por 5 minutos y transferir el sobrenadante a tubos eppendorf esterilizados de 1.5ml (usando tips de punta cortada).
- 7) Agregar 70uL de CTAB 10X (a 65°C) y agitar hasta homogenizar. agregar luego 650uL de cloroformo: etanol Isoamilico (24:1) y agitar hasta homogenizar completamente.
- 8) Centrifugar a 14 000 rpm por 5 minutos y transferir el sobrenadante a tubos de 1.5mL esterilizados.
- 9) Para la precipitación de los ácidos nucleicos, se agrega 500uL de isopropanol frio y se agita suavemente por espacio de 10 segundos. Se incuba a -20°C por 30 minutos.
- 10) Centrifugar a 14 000 rpm por 20 minutos. Decantar el isopropanol con cuidado de no perder el pellet, dejar los tubos invertidos por espacio de 1 minutos sobre papel toalla.
- 11) Para la purificación de los ácidos nucleicos, se agrega 500ul de etanol al 70% helado y se desprende el pellet de la base del tubo, centrifugar luego a 14 000 rpm por 15 minutos.

- 12) Decantar por espacio de 30 segundos en papel toalla.
- 13) Agregar 1mL de etanol al 90% y desprender el pellet de la base del tubo, para luego centrifugar a 14 000 rpm por 10 minutos.
- 14) Decantar el etanol por espacio de 10 segundos. Luego secar las muestras a temperatura ambiente.
- 15) Re suspender los ácidos nucleicos de cada pellet en 300uL de solución T10E1.
- 16) Por último dejar overnight a 4°C para la disolución total del pellet.

ANEXO III - Preparación de diluciones de ADN

Las diluciones se prepararon a partir de los valores obtenidos con el fluorímetro:

1. Se diluye con agua libre de nucleasas (NFW) la muestra de ADN, llevando a la concentración de 100ng/uL en microplacas de PCR-96-C-S estériles.
2. Se rotula las placas con el código correspondiente a cada muestra. Para la presente investigación se obtuvieron un total de 6 placas.
3. Antes de guardas las placas a -20°C se prepara una segunda dilución en nuevas placas llevando a 5ng/uL para el trabajo continuo, manteniéndose estas a 4°C .

ANEXO IV - Reacción en cadena de la polimerasa

La técnica de Reacción en cadena de la polimerasa sirve para amplificar un fragmento de ADN, generando así un amplicon mucho más fácil de analizar e identificar con una alta probabilidad.

Para realizar la técnica se necesitan: Los 4 desoxirribonucleicos-trifosfato (dNTP), 2 cebadores o oligonucleótidos iniciales, iones divalentes (actúan como cofactores de la polimerasa), una solución tampón o amortiguadora (mantenimiento del pH para el funcionamiento del ADN), ADN polimerasa, ADN molde y un termociclador.

La reacción de cadena de la polimerasa consiste en una serie de 20 a 35 cambios repetidos de temperatura llamados ciclos, cada ciclo consiste de 3 pasos definidos, enumerados a continuación (los tiempos y temperaturas a continuación son aquellas utilizadas en la presente investigación):

1. Primero se somete a la mezcla a una temperatura de 94°C, para activar la ADN polimerasa, este paso se lleva a cabo durante 4 minutos
2. A continuación se mantiene la temperatura a 94°C, durante 50 segundos para separar las dos cadenas del ADN molde.
3. Paso seguido se disminuye la temperatura en un rango de 49-62°C, durante 50 segundos, a esta temperatura los iniciadores hibridan a zonas complementarias en la doble cadena, flanqueando una zona específica a amplificar. Esta temperatura llamada temperatura de hibridación, variará dependiendo de las características de cada pareja de iniciadores.
4. Se eleva la temperatura a 72°C para producir la elongación de las cadenas complementarias (se unen los dNTP a la zona complementaria por acción de la ADN polimerasa).
5. Una vez terminado el ciclo en la elongación, comenzará un nuevo ciclo a partir del paso 2.
6. Una vez terminado el número de ciclos total programados, se someterá a la mezcla a 72°C por 5 minutos, este paso asegura que los ADN de cadena simple sean totalmente amplificados.
7. Pasado los 5 minutos la reacción permanecerá por tiempo indefinido a 4°C hasta sacarlos del termociclador.

ANEXO V - Lista de alelos exclusivos para cada comunidad en cada microsátélite

Co. L	Co.O	Alelos exclusivos						
		Pomamanta	Racracaya	Rangra	Quillcas	Marcavalle	Masma Chicche	Paca Paccha
S027	STM1064	0	0	0	0	0	0	0
S029	STPoAc58	0	0	0	0	1	0	0
S036	STM1053	0	0	0	0	1	0	0
S042	STM0037	0	0	0	0	2	0	0
S052	STM0031	0	0	0	0	1	0	0
S081	STM1104	0	0	0	0	0	0	0
S084	STM1052	0	0	0	0	1	0	0
S101	STM1106	0	0	0	0	0	2	0
S114	STM5114	0	0	0	0	2	0	0
S121	STM5121	0	0	0	0	0	0	0
S127	STM5127	0	0	0	0	2	0	0
S188	STG0010	0	0	0	0	0	0	0
S194	STG0016	0	0	0	0	0	0	0
S203	STG0025	0	0	0	0	0	0	0
S209	STI0001	0	0	0	1	0	0	0
S211	STI0004	0	0	0	0	0	0	0
S214	STI0012	0	0	0	1	0	0	1
S216	STI0014	0	0	0	0	0	0	0
S224	STI0030	0	0	0	3	0	0	0
S225	STI0032	0	0	0	2	1	0	0
S226	STI0033	0	0	0	1	1	0	0

ANEXO VI - Soluciones Stock

PREPARACIÓN DE GELES DE AGAROSA:

Gel mediano:

0.6g de agarosa (al 1%)
60ml de TBE 1X
600ml de TBE 1X en tanque

Gel grande:

2.5 de agarosa (al 1%)
250ml de TBE 1X
2L de TBE 1X en tanque

PREPARACIÓN DE TBE 10X:

Tris base	86.4g
Ácido bórico	44g
EDTA 0.5M (pH 8)	32ml
TOTAL	500ml

Autoclavar.

PREPARACIÓN CTAB 2X (mediana escala):

Tris HcL 1M (pH8)	80ml	100
NaCl 1.4M	65.45g	81.82
EDTA 0.5M	40ml	50
CTAB	16g	20
TOTAL	800ml	1L

Disolver reactivos a temperatura caliente (65°C). Luego Autoclavar.

PREPARACIÓN DE T₁₀E₁:

Tris HcL 1M (pH8)	10ml	4ml
EDTA 0.5M (pH 8)	2ml	0.8ml
TOTAL	1L	400ml

Autoclavar.

PREPARACIÓN DE TRIS HCl (pH8) 1M:

Tris base	96.8g	121.1
TOTAL	800ml	1L

Llevar a pH8 con HCl (al principio su pH se aproxima a 10.8, se agrega aproximadamente 80ml de HCl concentrado). Luego autoclavar

PREPARACIÓN DE EDTA 0.5M (pH8):

EDTA	148.8g	186.1
TOTAL	800ml	1L

Llevar a pH8 con NaOH (aprox. 100 pellets) dejar agitar por 1 hora. Luego autoclavar

PREPARACIÓN DE RNAsa:

Disolver RNAsa inicial a una concentración de 10ug/uL en 10mM de tris HCl pH7.5 y 15mM de NaCl, calentar a 100 grados Celsius por 15 minutos, luego sacar a Temp. Ambiente por 5 minutos. Almacenar a -20 grados Celsius.

tris HCl 1M (pH 7.5)	300uL
NaCl 5M	90uL
RNAsa	300ug
Agua destilada	30mL

PREPARACIÓN DE CTAB 10X:

			[] final
CTAB	5g	10g	10%
NaCl 1M	2.05g	4.09g	0.7%
EDTA 0.5M (pH8)	2ml	4ml	20mM
Tris HCl 1M (pH8)	5ml	10ml	100mM
TOTAL	50ml	100ml	

PREPARACIÓN 2X con PVP (pequeña escala):

			[] final
CTAB	2g	20g	2%
NaCl 1M	8.18g	81.81g	1.40%
EDTA 0.5M (pH8)	4ml	40ml	20mM
Tris HCl 1M (pH8)	10uL	100ml	100mM
PVP	1g	10g	1%
TOTAL	100ml	1L	

CTAB y PVP se agregan poco a poco para evitar grumos. Primero CTAB y luego PVP.

PREPARACIÓN BUFFER Bobs:

Tris base	12.11 (1M)
(NH ₄)SO ₄ (sulfato amonio)	2.64g (200mM)
MgCl ₂ -6H ₂ O (cloruro de magnesio)	0.51g (25mM)
H ₂ O MiliQ	enrazar a 100mL

Llevar a pH 9. Luego Autoclavar

PREPARACIÓN DE SOLUCIÓN STOP:

EDTA 0.5M	1ml
Azul de bromofenol	75 mg
Formamida	47.5ml
Nuclease Free Water	1ml