

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
LA MOLINA**

FACULTAD DE AGRONOMÍA



**“TAMIZADO DE PAPAS NATIVAS (*Solanum spp.*) TOLERANTES A
Phytophthora infestans (MONT.) DE BARY MEDIANTE
INICIADORES ALELO ESPECÍFICOS”**

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE
INGENIERA AGRÓNOMA**

NATALÍ CECILIA ACOSTA JARA

LIMA - PERÚ

2023

Tesis_Agronomia_Natali_Acosta_Jara

INFORME DE ORIGINALIDAD

14%	11%	8%	0%
INDICE DE SIMILITUD	FUENTES DE INTERNET	PUBLICACIONES	TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	Tiwari, Jagesh K., Sundaresha Siddappa, Bir Pal Singh, Surinder K. Kaushik, Swarup K. Chakrabarti, Vinay Bhardwaj, and Poonam Chandel. "Molecular markers for late blight resistance breeding of potato: an update", Plant Breeding, 2013. Publicación	4%
2	link.springer.com Fuente de Internet	2%
3	repositorio.unsch.edu.pe Fuente de Internet	2%
4	www.lamolina.edu.pe Fuente de Internet	2%
5	cpri.icar.gov.in Fuente de Internet	2%
6	tdx.cat Fuente de Internet	2%

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
LA MOLINA**

FACULTAD DE AGRONOMÍA

**“TAMIZADO DE PAPAS NATIVAS (*Solanum spp.*) TOLERANTES A
Phytophthora infestans (MONT.) DE BARY MEDIANTE
INICIADORES ALELO ESPECÍFICOS”**

NATALÍ CECILIA ACOSTA JARA

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE
INGENIERA AGRÓNOMA**

Sustentada y aprobada por el siguiente jurado:

Ing. Mg. Sc. Gilberto Rodríguez Soto
PRESIDENTE

Dr. Raúl Humberto Blas Sevillano
ASESOR

Ing. Mg. Sc. Rolando Percy Egúsqiza Bayona
MIEMBRO

Ing. Mg. Sc. Liliana María Aragón Caballero
MIEMBRO

Lima - Perú

2023

DEDICATORIA

A Henry y Carmen, mis padres,
por siempre haber confiado en mí y haberme
brindado apoyo en todo sentido.
A mis hermanos Henry y Camila.

A mi tía Liliana, mi abuelita Vilma y a mi primo
José por haberme ayudado desde el inicio
de mi etapa universitaria.

A todas las amigas y amigos que siempre me apoyaron
e hicieron que mi vida universitaria
sea una de las mejores experiencias.

AGRADECIMIENTOS

Al Instituto de Biotecnología- UNALM en convenio con la FAO por el apoyo en financiamiento en este trabajo de tesis.

Al Dr. Raúl Blas, por la guía, paciencia y atención brindada en cuanto a mis dudas en esta investigación.

Al Mg. Sc. Joel Flores por su constante apoyo, paciencia, humor y ánimo durante el tiempo en el que me guio en todo el proceso.

A los miembros del jurado: Liliana Aragón Caballero, Rolando Egúsqüiza Bayona y Alfredo Rodríguez Soto.

A mi familia, por su constante apoyo, aunque haya implicado separarme de ellos en busca de un crecimiento académico y profesional.

A mis amigas de laboratorio, Fabiola e Isamar, personas muy admirables, destacadas, inteligentes y esforzadas. Muchas gracias por su amistad y apoyo.

A mi amiga Ana Lucía, quien apareció para hacerme ver la generosidad y apoyo incondicional en persona.

A mi amiga María Fernanda, quien llegó en un momento inesperado, haciéndome dar cuenta de que las mejores compatibilidades también se dan en una amistad. Gracias por todas las charlas, experiencias y momentos de motivación en los tiempos que eran fugaces cuando estábamos juntas.

A mi amiga Camila, por todas las veces en las que me apoyó y motivó a seguir adelante en momentos muy complicados. Gracias por la paciencia, por dedicarme tiempo y por todas las reflexiones que me daba.

Por último, gracias a todos los que estuvieron en el proceso, ya sea animándome o aconsejándome de alguna manera, les aprecio mucho.

ÍNDICE GENERAL

I.	INTRODUCCIÓN.....	1
1.1.	Objetivo general.....	2
1.2.	Objetivos específicos	2
II.	REVISIÓN DE LITERATURA	3
2.1.	Generalidades del género <i>Solanum</i> L.	3
2.2.	Taxonomía	3
2.3.	Importancia agrícola de las papas nativas en el Perú.....	4
2.4.	Botánica y descripción botánica	5
2.5.	Fenología	7
2.6.	Antecedentes de especies nativas en el Perú	8
2.7.	Diversidad de papas nativas en Perú.....	8
2.7.1.	Centro de origen-diversidad.....	9
2.8.	Marcadores moleculares utilizados en Papa (<i>S. tuberosum</i>).....	9
2.9.	Estudio de <i>S. tuberosum</i> secc. Petota.....	9
2.9.1.	Genoma de <i>S. tuberosum</i> secc. Petota.....	10
2.10.	<i>Phytophthora infestans</i> (Mont.) de Bary	10
2.10.1.	Ciclo de vida de la enfermedad.....	11
2.10.2.	Agresividad de la enfermedad.....	13
2.10.3.	Interacción hospedante-patógeno.....	14
2.10.4.	Modelo zigzag de la reacción del sistema inmune de la planta	14
2.10.5.	Identificación de genes resistentes a <i>P. infestans</i> en <i>S. tuberosum</i>	15
2.10.6.	Aplicaciones de la PCR	22
III.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	25
3.1.	Ubicación del experimento	25
3.2.	Material vegetal	25
3.3.	Materiales y equipos	26
3.4.	Metodología.....	28
3.4.1.	Extracción de ADN.....	30
3.4.2.	Calidad de ADN (Electroforesis horizontal)	32
3.4.3.	Cantidad de ADN	32
3.4.4.	PCR para la detección de genes candidatos de tolerancia a <i>P. infestans</i>	32
3.5.	Análisis estadístico	34

IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	35
4.1. Pruebas preliminares de las primeras 96 muestras con el iniciador Phy 12	35
4.2. Pruebas preliminares con individuos resistentes y no resistentes.....	36
4.3. Prueba con la variedad “Capiro” (Susceptible)	38
4.4. Prueba de los nuevos primers con las variedades tolerantes y susceptibles	40
V. CONCLUSIONES	43
VI. RECOMENDACIONES.....	44
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45
VIII. ANEXOS.....	52

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Clasificación taxonómica de <i>S. tuberosum</i>	4
Tabla 2: Clasificación taxonómica de <i>P. infestans</i>	11
Tabla 3: Genes de Resistencia (R) y genes QTL identificados en varias especies de <i>Solanum</i>	16
Tabla 4: Genes de Resistencia (R) y genes QTL identificados en varias especies de <i>Solanum</i>	18
Tabla 5: Marcadores que han sido utilizados exitosamente en estudios de asociación de marcadores en el cultivo papa para <i>P. infestans</i> identificados.	20
Tabla 6: Marcadores moleculares asistidos para la resistencia de genes R y QTL al tizón tardío en papa.	21
Tabla 7: Genes que confieren resistencia a <i>P. infestans</i> derivados de <i>S. demissum</i> y <i>S. bulbocastanum</i>	22
Tabla 8: Primers reportados anteriormente para resistencia a <i>P. infestans</i> (Mont. De Bary)	29
Tabla 9: Datos Forward y Reverse de los primers utilizados en una segunda ronda de prueba.	29
Tabla 10: Cantidad de reactivos a utilizar (µl) en las mezclas para una, cuatro y cinco reacciones de amplificación en PCR.	33
Tabla 11: Temperaturas de anillamiento para cada primer en esta prueba.	34

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Planta de <i>Solanum tuberosum</i>	7
Figura 2: Ciclo sexual y asexual del tizón tardío.	13
Figura 3: Modelo zigzag de la reacción del sistema inmune de la planta.	15
Figura 4: Reacción de Cadena de la Polimerasa (PCR) representada en cadenas sucesivas.	23
Figura 5: Relación entre el tiempo y la temperatura del termociclador.	23
Figura 6: Esquema del proceso protocolar de extracción de ADN.	31
Figura 7: Gel con las amplificaciones de las primeras 50 muestras de toda la población y el primer Phy 12.....	35
Figura 8: Screening de todos los primers con variedades resistentes y no resistentes. (1) I-02 Tolerante; (2) I-06 Tolerante; (3) I-14 Susceptible; (4) Yana Huayro Susceptible.....	36
Figura 9: Variedad “Capiro” (Susceptible) puesta a prueba con el nuevo grupo de primers.	39
Figura 10: Primer grupo de resultados del gel con los individuos. 1 (302951.31-Tolerante); 2 (399077.59- Tolerante); 3 (397069.5-Susceptible) y 4 (Yana Huayro-Susceptible).	40
Figura 11: Segundo grupo de resultados del gel con los individuos. 1 (302951.31-Tolerante); 2 (399077.59- Tolerante); 3 (397069.5-Susceptible) y 4 (Yana Huayro-Susceptible).	41

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1: Flujograma del Protocolo General de extracción de ADN.	52
Anexo 2: Fotografías adicionales del proceso de extracción de ADN.....	53
Anexo 3: Datos detallados de los individuos utilizados en este trabajo.	54
Anexo 4: Problemas técnicos/manuales que podrían interferir en los resultados de amplificación en PCR.....	58

RESUMEN

La “rancho” es una de las principales enfermedades en el cultivo de papa (*Solanum spp.*) y es originada por el oomiceto *Phytophthora infestans* (Mont.) De Bary. Su presencia es mundialmente conocida por ser una enfermedad muy agresiva tanto en el follaje como en tubérculos desatando grandes pérdidas económicas. Sin embargo, a través del tiempo y con ayuda de los avances tecnológicos, su estudio se ha profundizado para poder brindar más herramientas y conocimientos sobre el desarrollo del patógeno . Actualmente, la biología molecular ha pasado a ser uno de los pilares más importantes para el descubrimiento de nueva información y referencias sobre *P infestans*. El presente trabajo tuvo la finalidad de comprobar el potencial de resistencia de una muestra de la gran diversidad de papas nativas del Perú, para esto, 182 accesiones de distintas zonas del país fueron colectadas y posteriormente evaluadas en el Instituto de Biotecnología -IBT UNALM. Se utilizaron 6 pares de primers (denominados para este estudio como: Phy12, Phy13, Phy14, Phy15, Phy16 y Phy 17) previamente reportados en otras investigaciones asociados a la tolerancia a rancho y otros 34 nuevos iniciadores alelo-específicos diseñados adicionalmente; todos los anteriores bajo la técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction). Los resultados fueron homogéneos en todas las amplificaciones. Es decir, ninguno de los iniciadores previamente seleccionados y ninguno de los nuevos diseñados seleccionados fueron efectivos en discriminar accesiones resistentes y susceptibles en el germoplasma de papas peruanas evaluadas, lo que demuestra que se deben de desarrollar iniciadores propios para la población de papas peruanas ya que los empleados para este estudio han sido desarrollados en otras poblaciones de papa adaptadas en otras latitudes.

Palabras clave: *Phytophthora infestans*, PCR, papa nativa, iniciadores.

ABSTRACT

The "rancha" is one of the main diseases in the cultivation of potato (*Solanum spp.*). It is caused by the oomycete *Phytophthora infestans* (Mont.) Bary. and its presence is known worldwide for being a very aggressive disease both in the leaves and in tubers unleashing great economic losses. However, over time and with the help of technological advances, its study has been deepened to provide more tools and knowledge about its development. Currently, molecular biology is one of the most important pillars for the discovery of new information and references about *P infestans*. This work had the purpose of verifying the resistance potential of the great diversity of potatoes native to Peru, for this, 182 accessions from different areas of the country were collected and evaluated at the Institute of Biotechnology -IBT UNALM. We used 6 pairs of primers (named for this study as: Phy12, Phy13, Phy14, Phy15, Phy16 and Phy 17) previously reported in other research associated with ranch tolerance and another 34 new allele-specific initiators additionally designed; all the above under the PCR (Polymerase Chain Reaction) technique. The results were homogeneous in all amplifications. That is, none of the previously selected initiators and the new ones designed were effective in discriminating resistant and susceptible accessions in the germplasm of Peruvian potatoes evaluated, which shows that they must develop their own initiators for the Peruvian potato population since those used have been developed in other potato populations adapted in other latitudes.

Key words: *Phytophthora infestans*, PCR, native potato, primers.

I. INTRODUCCIÓN

El género *Solanum* cuenta con especies cultivadas, entre ellas, las “Papas nativas”. Su amplia diversidad hace que produzca tubérculos de diversas características y que pueda ser cultivada bajo distintas condiciones. A lo largo del tiempo, las variedades comerciales han sido seleccionadas para cubrir las necesidades básicas de alimentación bajo el clima severo de los Andes. La selección realizada ha conllevado a mantener el germoplasma con buenas cualidades organolépticas así como la capacidad de tolerar enfermedades y estreses abióticos dentro de la misma parcela mediante el cultivo de papas nativas de diferentes ploidías (Bonierbale et al., 2004 ;citado por Ritter et al., 2009).

Por otro lado, se sabe que el tizón tardío o la ranca de la papa (*Phytophthora infestans* (Mont.) De Bary) es una de las principales enfermedades en este cultivo. Históricamente, en 1845 debido a la presencia del patógeno, Irlanda sufrió la destrucción del total de campos de papa y provocó la muerte de miles de personas, así como la migración de los sobrevivientes a lugares cercanos en Europa y hacia Norte América. Durante varios años los estudios se enfocaron en la etiología, epidemiología y control de la enfermedad, de esta manera el desarrollo de técnicas bioquímicas y moleculares han mejorado el estudio de la genética poblacional de este patógeno. Actualmente, existe un riesgo en la producción de este cultivo debido a que *P. infestans* puede variar genéticamente generando resistencia a fungicidas sistémicos, alta virulencia y mayor adaptación parasítica. Además, la presencia de oosporas (agentes de dispersión producto de la reproducción sexual del patógeno) representa un riesgo en zonas agrícolas donde nunca antes esta enfermedad se ha presentado (Forbes & Pérez, 2008).

La Reacción en Cadena de la Polimerasa, PCR (acrónimo de su nombre en Inglés Polymerase Chain Reaction) es una de las técnicas de la biología molecular que contribuye al análisis de datos mediante millones de copias de fragmentos de ADN para los diagnósticos en poco tiempo (Orengo, 2013).

Por lo tanto, en este trabajo se planteó el uso de la técnica PCR para el tamizado de germoplasma de papa que pueda ser tolerante a la racha para su uso en producción y en programas de mejoramiento genético.

1.1. Objetivo general

- Contribuir con el conocimiento sobre la reacción a *Phytophthora infestans* de accesiones de papas nativas cultivadas en el Perú.

1.2. Objetivos específicos

- Identificar genes candidatos asociados a la resistencia de *P. infestans*.
- Realizar el tamizado de papas nativas peruanas posiblemente tolerantes a *P. infestans*.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Generalidades del género *Solanum* L.

Solanum L. tiene una estimación de 1500 especies que lo conforman y es uno de los géneros más grandes de plantas con flores (Frodin, 2004 ;citado por Särkinen *et al.*, 2015). Este género tiene a las especies cultivadas más importantes a nivel mundial como el tomate (*S. lycopersicum* L.), la berenjena (*S. melongena* L.) y la papa (*S. tuberosum* L.) pero también puede considerarse importante de manera regional al pepino (*S. muricatum* Aiton) y a la naranjilla (*S. quitoense* Lam.).

Aun siendo de gran importancia económica, el género *Solanum* tiene una taxonomía incompleta, pero llega a ser uno de los diez más variados. En los Andes tropicales se intensifica la falta de orden en clasificación debido a que se encuentra la mayoría de las especies de manera muy distribuida y la gran cantidad de distintos nombres publicados ha hecho más complicada la labor taxonómica del mismo (Knapp 2002;Jørgensen *et al.*, 2011).

2.2 Taxonomía

En *Solanum* las especies tienen diversos tipos de hábito, desde hierbas hasta árboles de gran porte; pueden ser inermes o armadas con espinas o aguijones. En general, este género es conocido por la corola esteliforme, pentagonal, anteras conniventes, dehiscentes por poros apicales y el fruto en baya. En un contexto más práctico, si las hojas de estas plantas fueran estrujadas tendrían olor a papa cruda (Nee, 1999 citado por Granados-Tochay y Orozco-P, 2005).

El número básico de cromosomas en papa es de $x=12$ y es poliploide con variantes de $2n=24, 36, 48, 60$ y 72 . Al parecer la manera evolutiva de esta especie se realizó a nivel diploide (Ross, 1986). *Solanum tuberosum* ($2n=4x=48$) es la especie que cubre el 98% de la superficie a nivel global con las subespecies *tuberosum* y *andigena* que están adaptadas a latitudes de 25° a 50° S ó N y a fotoperiodo largo en el primer caso, mientras que en la segunda subespecie se adapta al rango que va desde 0° a 20° S ó N de día corto.

Tabla 1: Clasificación taxonómica de *S. tuberosum*.

Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Subclase	Asteridae
Orden	Solanales
Familia	Solanaceae
Género	Solanum
Especie	Tuberosum

Fuente: (Bodega, 2010)

2.3. Importancia agrícola de las papas nativas en el Perú

Según el IV Censo Nacional Agropecuario (2012), en el Perú, el cultivo de papa es el sustento de más de 710 mil familias afincadas predominantemente en zonas andinas del país. La superficie cosechada de este cultivo en el año 2016 fue de 311.2 mil hectáreas a nivel nacional, convirtiéndose en el segundo producto más importante de la agricultura del país, siendo solamente superado por el arroz. Se estima que en el 2016 se generaron 33,4 millones de jornales que representan alrededor del 4% del PBI agrícola. Además, el CENSO menciona que Perú usa 633 923 unidades agrarias (UA) (6 47 248 ha) para el cultivo de alguna variedad de papa, pero 200 300 UA se destinan a la producción de papa nativa. (MINAGRI, 2018).

Según Egúsquiza (2014), las papas nativas son las cultivadas por agricultores tradicionales que han seleccionado distintas variedades de esta especie desde los inicios de la agricultura en su entorno. En las comunidades campesinas existen mezclas de siembra de variedades a una altitud de 3200 m.s.n.m. Esta es una estrategia a manera de contrarrestar la dispersión de plagas y enfermedades con el objetivo de tener una buena producción de alimentos por si se diera el caso de la aparición de sequías, heladas, etc. Además, mediante distintas formas de preservar este cultivo se ha logrado la revaloración y posterior conservación de las distintas variedades con características físicas y genéticas propias debido a la gran variabilidad de esta especie.

2.4. Botánica y descripción botánica

La Figura 1. representa la morfología de *S. tuberosum* y según Inostroza *et al.* (s. f.), las características más sobresalientes de las partes de la planta de papa son:

a) Raíz

El desarrollo de la planta está basado en la siembra de tubérculos. El crecimiento originado del tubérculo primero forma raíces adventicias en la base de cada brote y posteriormente las forma encima de los nudos en la parte subterránea de cada tallo.

La papa tiene un sistema radicular débil por lo que se necesita de suelo en muy buenas condiciones físicas y químicas para un mejor desarrollo ya que crece de forma delicada y superficial.

b) Tallo

Los tallos subterráneos cuentan con estolones y tubérculos, así las plantas que provienen de tubérculo-semilla pueden desarrollar varios tallos.

Con respecto a las formas, estos pueden ser angulares o circulares. Los tallos generados son de color verde y algunas veces de otras tonalidades como marrón rojizo o morado.

Las yemas que se forman en las axilas de las hojas pueden formar tallos laterales, estolones, inflorescencias y tubérculos aéreos en algunos casos.

c) Estolones

Los estolones son tallos laterales que crecen horizontalmente por debajo del suelo a partir de yemas de la parte subterránea de los tallos. Debido a que los estolones largos son comunes en los cultivos nativos o papas silvestres, el mejoramiento de la papa tiene como uno de los objetivos tener estolones cortos.

Los tubérculos pueden ser formados mediante el agrandamiento del extremo terminal del estolón, pero si éste no es cubierto por el suelo, puede desarrollarse como tallo aéreo menos vigoroso.

d) Tubérculos

Son tallos modificados y constituye uno de los principales órganos de almacenamiento de fotosintatos por este cultivo. Los “ojos” se distribuyen sobre el tubérculo en espiral y cada uno tiene varias yemas.

e) Brotes

Crece de las yemas que se encuentran en los ojos del tubérculo y una característica varietal importante se interpreta en el color. Cuando los brotes blancos se exponen indirectamente a la luz se tornan verdes.

El extremo apical del brote da origen a las hojas y representa una parte del tallo donde tiene lugar el crecimiento de este.

f) Hojas

Distribuidas en espiral sobre el tallo y tienen un raquis central con varios folíolos. Cada foliolo puede estar unido al raquis por un pequeño peciolo llamado peciólulo o puede ser un foliolo sésil unido directamente al raquis. El tipo de inserción del peciolo puede extenderse hacia abajo, las alas o costillas del tallo.

g) Inflorescencia, flor

Dos ramas dividen el pedúnculo, y éstas a la vez se subdividen en otras dos ramas las cuales definen a una inflorescencia denominada “cimosa”. Las ramas de las inflorescencias originan a los pedicelos en cuyas puntas superiores se encuentran los cálices.

Las flores de papa son bisexuales, es decir, tienen ambos sexos y poseen cáliz, corola, estambres y pistilo.

h) Fruto y semilla

El fruto es esférico, pero puede ser ovoide o cónico en algunas variedades. Comúnmente es de color verde y tiene aproximadamente 200 semillas de acuerdo con la fertilidad de cada cultivar.

El ovario se desarrolla para convertirse en baya con numerosas semillas luego de ser fertilizado. Las semillas están envueltas en una capa llamada testa usada para proteger al embrión y un tejido nutritivo de reserva llamado endospermo.

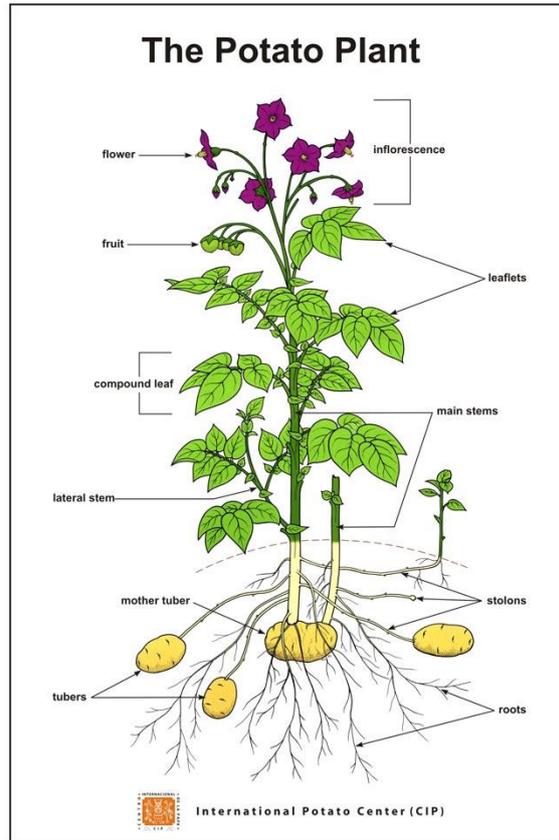


Figura 1: Planta de *Solanum tuberosum*.
Fuente: CIP (s.f)

2.5. Fenología

Según la escala BBCH (Bleiholder *et al.*, 2001) se hace una descripción breve del crecimiento y desarrollo del cultivo:

Estadío principal 0. Germinación/ Brotación: Los brotes del tubérculo semilla se desarrollan y forma raíces y tallos que crecen hasta traspasar la superficie del suelo.

Estadío principal 1. Desarrollo de las hojas: Las primeras hojas comienzan a alargarse.

Estadío principal 2. Formación de los brotes laterales: Los brotes basales y laterales se van haciendo visibles.

Estadío principal 3. Crecimiento longitudinal (brotes principales): Comienza la cobertura del cultivo.

Estadío principal 4. Desarrollo de las partes vegetativas cosechables: Comienzo de la formación de tubérculos con las puntas del primer estolón hinchadas dos veces el diámetro del resto del estolón. A lo largo del tiempo se debe de llegar al desarrollo de un 95% de tubérculos.

Estadio principal 5. Aparición del órgano floral: Botones florales de las inflorescencias visibles, pétalos de las flores visibles por encima de los sépalos y finalmente desarrollo de la inflorescencia de grado “n”.

Estadio principal 6. Floración: Apertura de flores en orden de secuencia.

Estadio principal 7. Formación del fruto: Desarrollo de primeras bayas visibles hasta la fructificación de un tamaño final.

Estadio principal 8. Maduración de frutos y semillas: Bayas maduras y semillas en el interior.

Estadio principal 9. Senescencia: Amarillamiento de las hojas. Posteriormente, tallos secos y blanquecinos que dan la señal de cosecha.

2.6. Antecedentes de especies nativas en el Perú

Según la lista previa hecha por Brako & Zarucchi (1993) citados por Särkinen *et al.* (2015) en Perú se registran 301 especies silvestres y 102 de ellas (lo que representa un 34%) fueron denominadas como endémicas en el Libro Rojo del Perú (Knapp *et al.*, 2007). Muchas colecciones adicionales están ya disponibles en los herbarios de todo el Perú para permitir una mejor estimación de la diversidad y distribución de las especies de *Solanum* en el país (Särkinen *et al.*, 2015).

2.7. Diversidad de papas nativas en Perú

Según INIA solamente en Perú se encuentran más de 3000 cultivares de papas nativas de alta calidad empleadas en la agricultura de la región andina, dinamizando la economía de la agricultura familiar y abasteciendo las cosechas a todos los mercados de todo el país. De otro lado, el CIP (Centro Internacional de la Papa) mantiene en custodia 2700 variedades nativas como base para la generación de otras nuevas mejoradas nutricionalmente por ejemplo.

Hay una gran correlación entre la riqueza de especies y la densidad de la colección (número de especies/km²). En el Perú se identificaron cinco centros de diversidad de especies: (1) muy al norte de Cajamarca y Amazonas, (2) alrededores de Cajamarca, (3) La Divisoria (Huánuco) y Oxapampa (Pasco). (4) Cusco y (5) sierra al este de Lima. La diversidad más alta está presente a lo largo de las laderas orientales de la Cordillera Oriental.

2.7.1. Centro de origen-diversidad

Las papas silvestres (*Solanum* sección *Petota*) pueden crecer en zonas que abarcan desde el Suroeste de los Estados Unidos de Norteamérica hasta el sur de Chile. La mayoría de las especies crecen en los Andes (D.M. Spooner *et al.*, 2004). El origen de las papas silvestres está sujeto a discusión ya que según Hawkes (1990), se originaron en Norte y Centro América como especies diploides y de genoma tipo B, las cuales migraron a América del Sur donde se evolucionó al genoma tipo A. Sin embargo, Simon *et al.* (2011) manejan la hipótesis de que *Solanum* sección *Petota* apareció en América del Sur por la razón de que el grupo hermano silvestre de las papas silvestres (*Solanum* sección *Lycopersicon* y *Solanum* sección *Juglandifolium*) tienen una distribución geográfica en América del Sur.

2.8. Marcadores moleculares utilizados en Papa (*S. tuberosum*)

Los marcadores moleculares representan nuevas herramientas poderosas para reinvestigar hipótesis de hibridación. Una forma de usarlos es para buscar aditividad de marcadores moleculares específicos-parentales en los híbridos. La utilidad del método depende de descubrir marcadores específicos de especies, aunque esto puede ser difícil porque muchos híbridos están entre taxas muy relacionadas que no han divergido lo suficiente para haber formado marcadores específicos (David M. Spooner, van den Berg, Bryan, & del Rio, 2003). Sin embargo, puede darse el caso de que el uso de este método disminuya debido al tiempo de divergencia, como lo mostraron Song *et al.* (1995) con la gran pérdida de marcadores y nuevos candidatos de los mismos para aparecer en sólo la generación F5 de un híbrido artificial interespecífico de *Brassica*. Por lo tanto, se puede considerar el hecho de que los marcadores de ambos parentales pueden ser disruptivos a través de la recombinación y también puedan mutar con el tiempo.

2.9. Estudio de *S. tuberosum* secc. *Petota*

La papa y los papas silvestres de *Solanum* L. sección *Petota* Dumort., están distribuidos desde el Suroeste de Estados Unidos hasta el Sudeste de Chile con amplia concentración de diversidad en los Andes. Esta sección presenta muchos desafíos para los taxónomos surgiendo desde la similitud de las especies, plasticidad fenotípica, rango de niveles de ploidía desde los diploides hasta los hexaploides, especiación híbrida e introgresión (David M. Spooner *et al.*, 2003).

Hawkes (1990) reconoció 232 especies, repartidas en 21 series (éstas son elegidas por los taxónomos debido a grandes diferencias entre ellas). Después, se actualizaron a 196 especies silvestres y 7 especies cultivadas considerando cambios taxonómicos (nuevas descripciones de especies y algunos sinónimos) realizados desde 1990 (D.M. Spooner & Hijmans, 2001).

2.9.1. Genoma de *S. tuberosum* secc. Petota

Estudios llevados a cabo anteriormente reconocen a la sección Petota como un grupo monofilético pero existen tantos tratamientos taxonómicos distintos que difieren muy ampliamente en sus hipótesis sobre el número de especies y la afiliación a las series (por ejemplo: Correll 1962; Hawkes 1990; Ochoa 1999) generando confusión entre los usuarios en cuanto a la mejor taxonomía a usar así como la confiabilidad de la misma si es que se eligiera alguna (David M. Spooner *et al.*, 2003). Los datos de los sitios de restricción de cloroplastos en el ADN (Rodríguez and Spooner 1997; Spooner and Castillo, 1997; Castillo and Spooner 1997 citados por (Spooner *et al.* 2003) han sugerido que las 21 series de Hawkes (1990) no son grupos naturales, pero respaldan sólo 4 ramas del árbol filogenético (clados). Alrededor de 20% de aproximadamente 200 especies silvestres son de origen híbrido poliploide (Spooner and van den Berg, 1992).

2.10. *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary

Según Fry *et al.* (1993), este género fue descrito por Antón de Bary en 1878 y *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary fue utilizada como especie tipo, es decir, ejemplar de una especie cuya descripción se ha validado en alguna publicación que corroboró el nombre científico de la misma.

Actualmente, el análisis molecular de ARN ribosómico y datos estructurales de la pared celular incluye al género *Phytophthora* dentro del reino Cromista (Stramenophila) y se relaciona filogenéticamente con algas pardas y diatomeas (Bonierbale, Haan, & Forbes, 2010). Además, este patógeno perteneciente a la clase Oomycete, es diferente a los hongos verdaderos por tres factores que incluyen: Pared celular compuesta de β -glucanos, ya que los hongos tienen quitina; no síntesis de esteroides y la fase zoospórica en el ciclo de vida (Bartnicki-Garcia y Wang (1983) citados por Dean *et al* (2014). Para finalizar, los oomicetos producen esporas sexuales esféricas, también llamadas oosporas, con multipared que permite sobrevivir ante condiciones adversas del ambiente (Judelson, 2014). La clasificación

taxonómica de *Phytophthora* ha evolucionado desde esquemas fundados en morfología hasta cladogramas filogenéticos basados en marcadores moleculares identificados de proyectos de secuenciación (Blair, Coffey, Park, Geiser, & Kang, 2008). A continuación, la Tabla 2 presenta la clasificación taxonómica de la especie:

Tabla 2: Clasificación taxonómica de *P. infestans*

REINO: Cromista (grupo <i>Stramenophyle</i>)
PHYLUM: Oomycota
CLASE: Oomycete
SUBCLASE: Peronosporomycetidae
ORDEN: Phythiales
FAMILIA: Phytiaceae
GÉNERO: <i>Phytophthora</i>
ESPECIE: <i>infestans</i>

Fuente: (Raven *et al.* 1999; Evert y Eichhorn, 1999; Erwin y Ribeiro, 1996)

2.10.1. Ciclo de vida de la enfermedad

El patógeno tiene un ciclo de vida sexual y otro predominantemente asexual que incluye la formación de esporangios. En la naturaleza, el crecimiento inicia cuando los esporangios se mueven a través del viento o el agua hacia un nuevo hospedante, a su vez, éstos pueden extender los tubos germinativos directamente, aunque lo más común es la germinación indirecta de estas esporas multinucleadas cuyo interior tiene cerca de 8 zoosporas mononucleadas que son liberadas al ambiente (Judelson & Blanco, 2005).

Según Latijnhouwers y Govers (2003), la liberación de las zoosporas típicamente ocurre dentro de una o dos horas después de que el esporangio esté ubicado en una superficie fría y húmeda, una situación común a tempranas horas del día. Las zoosporas son biflageladas y poseen quimiotaxis, que es un tipo de fenómeno por el cual las bacterias u otros organismos uni o pluricelulares dirigen sus movimientos de acuerdo a las concentraciones de sustancias químicas en su entorno.

a) Ciclo asexual

El ciclo asexual sólo tiene un tipo de apareamiento. Una cepa que se reproduce produce un conjunto de aislados conocidos como linajes clonales. En este caso, el tipo de variabilidad se originaría por mutación al no haber recombinación meiótica (Fry, 2008). La reproducción descrita se da a través de esporangios, zoosporas e hifas. Las zoosporas son formadas dentro del esporangio y son estructuras hialinas con morfología limoniforme, que contiene de 6 a 10 núcleos en su interior. El tamaño varía de 36x22 µm a 29x19 µm, y son liberadas en la ruptura de la pared esporangial. Posteriormente, son dispersadas por el viento lo que permite que alcancen tejidos de las plantas huéspedes y germinan cuando hay condiciones favorables en el ambiente (Forbes *et al.*, 2008).

Cuando hay agua, las zoosporas nadan en busca de lugares sólidos en donde puedan enquistarse para desarrollar el tubo germinativo y penetrar la hoja por los estomas o en caso contrario, forman apresorios cuyas hifas de penetración ingresan a través de la cutícula.

Ya dentro de la planta el micelio se desarrolla intercelularmente con la formación de haustorios (Jaramillo, 2003). Luego de 10 días de infección los esporangios emergen por los estomas de la planta huésped.

b) Ciclo sexual

Ya que *P. infestans* es una especie heterotálica necesita dos tipos de apareamiento (A1 y A2), así que demanda de la coexistencia tanto en espacio como en tiempo para que pueda producirse la reproducción sexual.

Aunque suceda lo anterior, la diferencia entre ambos grupos no radica en un dimorfismo sexual, ya que ambos tipos presentan órganos reproductores tanto masculinos como femeninos en el mismo individuo pero radica mucho en la autoincompatibilidad de éstos y en el requerimiento de una estimulación hormonal de un tipo de apareamiento opuesto para que se pueda dar ese tipo de reproducción (Forbes *et al.*, 2008).

Según Smart, Sandrock, & Fry (2000), la meiosis ocurre justo antes del desarrollo de los gametangios, en donde se representa el único estado haploide del ciclo de vida de este organismo. La cariogamia se da entre dos núcleos haploides que forman una oospora diploide de paredes gruesas con un solo núcleo y todo en conjunto forma una estructura de supervivencia para temporadas frías en las zonas templadas.

Los ciclos descritos anteriormente son representados en la Figura 2.

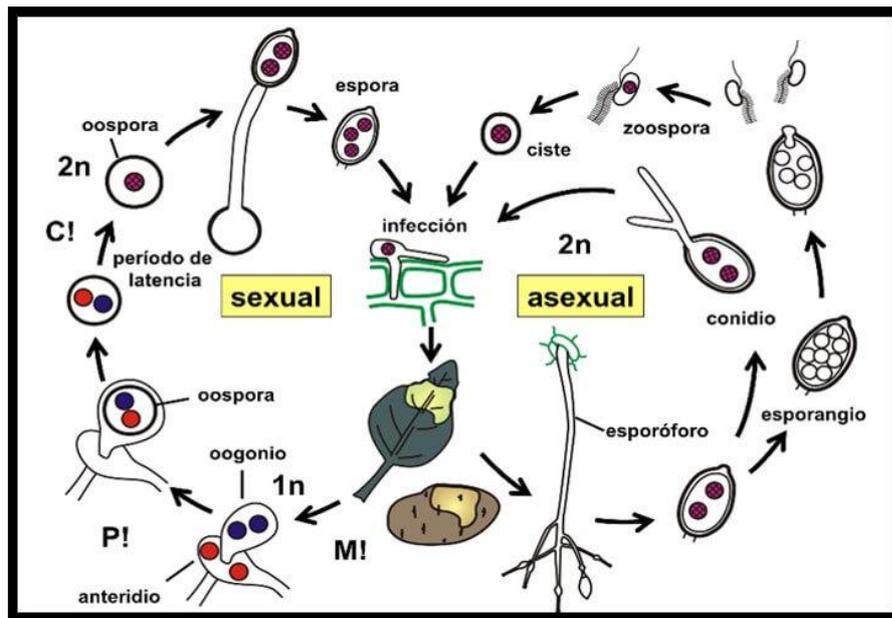


Figura 2: Ciclo sexual y asexual del tizón tardío.
Fuente: Piepenbring (2015) n uy

2.10.2. Agresividad de la enfermedad

La agresividad es definida como la habilidad total del patógeno para atacar a su planta hospedera (Cooke & Deahl, 1998). Las aptitudes predictivas de un patógeno pueden ser estimadas usando una sola generación de medidas de “componentes de capacidad” como el periodo latente de eficiencia de infección (Antonovics & Alexander, 1989). De otro lado, otros estudios según Colon & Budding (1988) están más relacionados a componentes de resistencia.

Los hospederos pueden crecer en un rango de altura dentro de 1200 y 4000 m.s.n.m. en una variedad de ambientes y microclimas. Las especies que tienen tubérculos, como *S. tuberosum*, son generalmente atacados en sus hábitats naturales por la línea clonal EC-1 (Adler *et al.*, 2004). Aunque hay similitud genética aparente entre colecciones aisladas de *P. infestans* en hospedantes como papas nativas, permanece aún sin aclarar si las diferencias entre la agresividad y la adaptación de las especies hospedantes podrían existir en este grupo. Las diferencias en la agresividad o aptitud de la enfermedad en especies hospedantes particulares pueden ser consideradas como indicadores más precisos de especificidad de los mismos (Suassuna, Maffia, & Mizubuti, 2004).

Pocos estudios epidemiológicos que involucraron muestras aisladas han sido realizados en especies nativas de papa (Garry *et al.*, 2005). Además, se tiene evidencia de la especificidad

del hospedante de poblaciones de *P. infestans* atacando varias especies no tuberizantes en *Solanum* (Oyarzun, Pozo, Ordoñez, Doucett, & Forbes, 1998). Aún hay poca información de la especificidad del hospedante en las poblaciones del patógeno atacando especies nativas de *Solanum*.

Muchas especies nativas de *Solanum* han sido usados como fuente de resistencia a *P. infestans* en los programas de mejoramiento (Tazelaar, 1981). Si las especies nativas son cruzadas con las papas cultivadas y cada grupo parental tiene diferentes poblaciones de patógenos, la progenie podría segregar para un factor de especificidad del hospedante en donde algunos genotipos serían resistentes a una sola población del patógeno.

2.10.3. Interacción hospedante-patógeno

Los hongos pueden directamente entrar a las células epidermales de la planta o extender hifas en la superficie, entre o a través de las mismas. Los hongos simbióticos, patógenos y oomicetos pueden invaginar estructuras de alimentación (haustorios) dentro del plasma de la membrana de la célula hospedera. Los plasmas de las membranas haustoriales, la matriz extracelular y las membranas plasmáticas del hospedero forman una interfase íntima en la cual el resultado de la interacción es determinado. Todas estas diversas clases de patógenos conducen moléculas efectoras (factores de virulencia) en las células de las plantas para mejorar la aptitud microbial (Dangl & Jones, 2001).

Las plantas, a diferencia de los animales, carecen de células defensoras y de un sistema somático inmune adaptativo. Por lo tanto, ellas poseen en la inmunidad innata de las células y en señales sistémicas emanadas desde los sitios de infección (Ausubel, 2001). En estudios previos, ya se tienen diversidad de proteínas resistentes a enfermedades (R), polimorfismo en el loci R en especies nativas y falta de resistencia en el campo sucesivamente y la cadena de respuestas celulares que seguían de la activación de la proteína R (Chisholm, Coaker, Day, & Staskawicz, 2006).

2.10.4. Modelo zigzag de la reacción del sistema inmune de la planta

Según Jones & Dangl (2006), el modelo zigzag explica la resistencia cuantitativa del sistema inmune de las plantas. En este caso, la última amplitud de la resistencia o susceptibilidad de la enfermedad es proporcional a (PTI-ETS+ETI) como se muestra en la imagen la Figura 3.

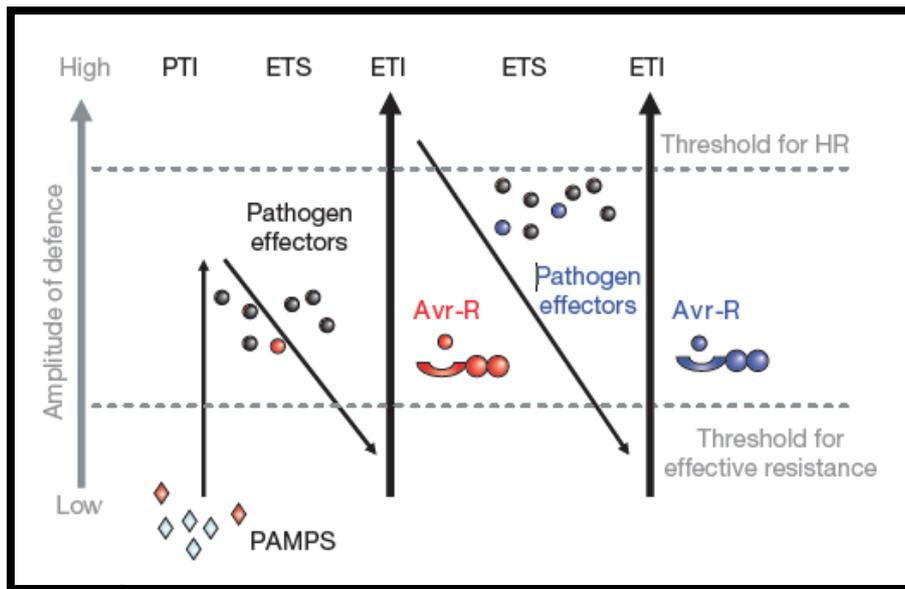


Figura 3: Modelo zigzag de la reacción del sistema inmune de la planta
Fuente: Jones & Dangl (2006)

Por lo tanto en la fase 1, las plantas detectan patrones moleculares asociados a microbios o patógenos (PAMPs) vía patrones receptores de reconocimiento (PRRs) con el fin de provocar la inmunidad activada por PAMPs (PTI). En la fase 2, los patógenos dirigen exitosamente a sus efectores que interfieren con PTI o de otra manera habilitan la nutrición y dispersión del patógeno resultando en la susceptibilidad activada por el efector (ETS). En la fase 3, un efector (indicado en rojo) es reconocido por una proteína NB-LRR para producir la activación de la inmunidad por los efectores (ETI), una versión amplificada de PTI que usualmente en lo sucesivo pasa por inducción a la hipersensibilidad (HR) de la muerte celular. Por último, en la fase 4, se seleccionan los patógenos aislados que han perdido sus efectores (marcados en rojo) pero tal vez ganaron nuevos efectores a través del flujo genético horizontal (en azul) los cuales pueden ayudar al patógeno a suprimir el ETI. La selección favorece a los alelos NB-LRR de las nuevas plantas que pueden reconocer uno de los recientes efectores adquiridos, resultando otra vez en ETI.

2.10.5. Identificación de genes resistentes a *P. infestans* en *S. tuberosum*

a) Genes R

Genes únicos para la resistencia al tizón tardío (Genes “R”) fueron descubiertos hace casi 100 años en *S. demissum*, una especie nativa de México. Sin embargo, la introgresión de los genes R dieron resistencia específica de razas en los cultivares híbridos de papa generando

solo resistencia transitoria a *P. infestans.*, como nuevas razas rápidamente superaron la resistencia mediada por los genes R (Fry & Goodwin, 1997). Estos genes se muestran en las Tablas 3 y 4.

b) Genes cuantitativos

La resistencia cuantitativa o resistencia de campo al tizón tardío también ha sido identificada en especies nativas (Ross, 1986). Esta resistencia es mejor y más duradera que las mediadas por los genes R pero es difícil de llevar entre variedades cultivadas por cruzamiento o selección fenotípica.

Muchos genes de resistencia se originaron de la introgresión de *S. demissum*, *S. bulbocastanum* y *S. berthaultii* y han sido encontrados en los cromosomas de la papa usando marcadores de ADN (Ballvora *et al.*, 2002). Sin embargo, en el nuevo milenio se han reportado otras fuentes de resistencia en las siguientes especies: *S. acaule* (4x/2EBN), *S. ajanhuiri* (2x/2EBN), *S. alandiae* (2x/2EBN), *S. astleyi* (2x/2EBN), *S. avilesi* (2x/2EBN), *S. berthaultii* (2x/2EBN), *S. bolivense* (2x/2EBN), *S. brachistotrichum* (2x/1EBN), *S. brachycarpum* (6x/4EBN), *S. bulbocastanum*, *S. capsicibaccatum* (2x/1EBN), *S. caripense* (2x), *S. cardiophyllum* (2x, 3x/1EBN), *S. chacoense* (2x/2EBN), *S. circaeifolium spp. quimense* (2x/1EBN), *S. commersonii* (2x/1EBN) (Tabla 3).

Tabla 3: Genes de Resistencia (R) y genes QTL identificados en varias especies de *Solanum*.

Especie	Cromosoma	Resistente/R gen /QTL	Referencias
<i>S. acaule</i> (4x/2EBN)	-	Resistant	Budin (2002)
<i>S. ajanhuiri</i> (2x/2EBN)	-	Resistant	Gabriel <i>et al.</i> (2007)
<i>S. alandiae</i> (2x/2EBN)	-	Resistant	Bradshaw and Ramsay (2005)
<i>S. astleyi</i> (2x/2EBN)	-	Resistant	Galarreta <i>et al.</i> (1998)
<i>S. avilesi</i> (2x/2EBN)	11	<i>Rpi-avl1</i>	Verzaux (2010)
<i>S. berthaultii</i> (2x/2EBN)	10	<i>Rpi-ber1</i> and <i>Rpi-ber2</i>	Rauscher <i>et al.</i> (2006); Park <i>et al.</i> (2009a)
<i>S. bolivense</i> (2x/2EBN)	-	Resistant	Budin (2002)
<i>S. brachistotrichum</i> (2x/1EBN)	4	<i>Rpi-bst1</i>	Hein <i>et al.</i> (2009)
<i>S. brachycarpum</i> (6x/4EBN)	-	Resistant	Budin (2002)
<i>S. bulbocastanum</i>	8 (<i>Rpi-blb1</i> and <i>Rpi-bt1</i>), 6 (<i>Rpi-blb2</i>), and 4 (<i>Rpi-blb3</i> and <i>Rpi-abpt</i>)	RB/ <i>Rpi-blb1</i> , <i>Rpi-blb2</i> , <i>Rpi-blb3</i> , <i>Rpi-abpt</i> and <i>Rpi-bt1</i>	Naess <i>et al.</i> (2000); van der Vossen <i>et al.</i> (2003, 2005); Park <i>et al.</i> (2005a, b); Lokossou <i>et al.</i> (2009); Oosumi <i>et al.</i> (2009)
<i>S. capsicibaccatum</i> (2x/1EBN)	11	<i>Rpi-cap1</i>	Jacobs <i>et al.</i> (2010)
<i>S. caripense</i> (2x)*	9	-	Nakitandwe <i>et al.</i> (2007)
<i>S. cardiophyllum</i> (2x, 3x/1EBN)	-	Resistant	Thieme <i>et al.</i> (2010)

<i>S. chacoense</i> (2x/2EBN)	-	Pi_QTL	Bradshaw and Ramsay (2005)
<i>S. circaeifolium</i> spp. <i>quimense</i> (2x/1EI)	11	<i>Rpi-qum1</i>	Verzaux (2010)
<i>S. commersonii</i> (2x/1EBN)	-	Resistant	Bradshaw and Ramsay (2005)
<i>S. demissum</i> (6x/4EBN)	5 (R1), 4 (R2 and Rpi-dn 11 (R3-R11 except 9 (R8)	<i>R1, R2, R3</i> (<i>R3 & R3b</i>), <i>R4, R5, R6,</i> <i>R7, R8, R9,</i> <i>R10, R11</i> and <i>Rpi-dmsf1</i>	Huang <i>et al.</i> (2005); Bradshaw <i>et al.</i> (2006b, c); Hein <i>et al.</i> (2009); Vleeshouwers <i>et al.</i> (2011); Jo <i>et al.</i> (2011)
<i>S. dulcamara</i> (2x)*	9	<i>Rpi-dlc1</i>	Golas <i>et al.</i> (2010)
<i>S. edinense</i> (5x)*	4	<i>Rpi-edn1.1</i>	Champouret (2010)
<i>S. fendleri</i> (4x/2EBN)	-	Resistant	Bradshaw and Ramsay (2005)
<i>S. hjertingii</i> (4x/2EBN)	4	<i>Rpi-hjt1.1,</i> <i>Rpi-hjt1.2</i> and <i>Rpi-hjt1.3</i>	Champouret (2010)
<i>S. hougasii</i> (6x/4EBN)	-	Resistant	Bradshaw and Ramsay (2005)
<i>S. iopetalum</i> (6x/4EBN)	-	Resistant	Bradshaw and Ramsay (2005)
<i>S. juzepczukii</i> (3x)*	-	Resistant	Gabriel <i>et al.</i> (2007)
<i>S. kurtzianum</i> (2x/2EBN)	-	Pi_QTL	Budin (2002)
<i>S. leptophyes</i> (2x/2EBN); (4x/4EBN)	-	Resistant	Budin (2002)
<i>S. megistacrolobum</i> (2x/2EBN)	-	Resistant	Budin (2002)
<i>S. michoacanum</i> (2x)*	-	Resistant	Szczerbakowa <i>et al.</i> (2010)
<i>S. microdontum</i> (2x/2EBN), 3x	4	<i>Rpi-mcd1</i>	Tan (2008)
<i>S. mochiquense</i> (2x/1EBN)	9	<i>Rpi-mcq1</i>	Smilde <i>et al.</i> (2005)
<i>S. nigrum</i> (2x)*	-	Resistant	Lebecka (2009)
<i>S. papita</i> (4x/2EBN)	8	<i>Rpi-pta1</i> and <i>Rpi-pta2</i>	Vleeshouwers <i>et al.</i> (2008), Wang <i>et al.</i> (2008)
<i>S. paucissectum</i> (2x/2EBN)	10, 11 and 12	QTLpcs10, QTLpcs11, QTLpcs12	Villamon <i>et al.</i> (2005)
<i>S. phureja</i> (2x/2EBN)	9	<i>Rpi-phu1</i>	Sliwka <i>et al.</i> (2006)
<i>S. pinnatisectum</i> (2x/1EBN)	7	<i>Rpi-pnt1</i>	Kuhl <i>et al.</i> (2001)
<i>S. polyadenium</i> (2x/1EBN)	-	Resistant	Budin (2002)
<i>S. polytrichon</i> (4x/2EBN)	8	<i>Rpi-plt1</i>	Wang <i>et al.</i> (2008)
<i>S. raphanifolium</i> (2x/2EBN)	-	Resistant	Galarreta <i>et al.</i> (1998)
<i>S. sanctae-rosae</i> (2x/2EBN)	-	Resistant	Budin (2002)
<i>S. schenkii</i> (6x/4EBN)	4	<i>Rpi-snk1.1</i> and <i>Rpi-snk1.2</i>	Jacobs <i>et al.</i> (2010); Champouret (2010)
<i>S. sparcipilum</i> (2x/2EBN)	10	Pi_QTL	Danan <i>et al.</i> (2009)
<i>S. spegazzini</i> (2x/2EBN)	10	Pi_QTL	Danan <i>et al.</i> (2009)
<i>S. stenotomum</i> (2x/2EBN)	-	Pi_QTL	Gabriel <i>et al.</i> (2007)
<i>S. stoloniferum</i> (4x/2EBN)	8 (Rpi-sto1) and 11 (Rpi-sto2)	<i>Rpi-sto1</i> and <i>Rpi-sto2</i>	Champouret (2010); Wang <i>et al.</i> (2008); Vleeshouwers <i>et al.</i> (2008, 2011)
<i>S. sucrense</i> (4x/4EBN)	-	Resistant	Gabriel <i>et al.</i> (2007)
<i>S. tarijense</i> (2x/2EBN)	-	Pi_QTL	Budin (2002)
<i>S. tarnii</i> (2x/2EBN)	-	Resistant	Thieme <i>et al.</i> (2008)
<i>S. toralapanum</i> (2x)*	-	Resistant	Budin (2002)
<i>S. trifidum</i> (2x/1EBN)	-	Resistant	Budin (2002)
<i>S. tuberosum</i> subsp. <i>tuberosum</i> (4x/4EBN)	3–6, 8, 9 and 11	Pi_QTL	Costanzo <i>et al.</i> (2005); Bradshaw <i>et al.</i> (2006a)
<i>S. tuberosum</i> subsp. <i>andigena</i> (4x/4EBN)	-	Pi_QTL	Gabriel <i>et al.</i> (2007)
<i>S. venturii</i> (2x/2EBN)	9	<i>Rpi-vnt1.1,</i> <i>Rpi-vnt1.2</i> and <i>Rpi-vnt1.3</i>	Foster <i>et al.</i> (2009); Pel <i>et al.</i> (2009)
<i>S. vernei</i> (2x/2EBN)	-	Pi_QTL	Budin (2002)
<i>S. verrucosum</i> (2x/2EBN)	6	<i>Rpi-ver1</i>	Jacobs <i>et al.</i> (2010)
<i>S. vigultorum</i> (2x)*	-	Resistant	Galarreta <i>et al.</i> (1998)
Unknown	4	<i>R2-like</i>	Lokossou <i>et al.</i> (2009)
<i>S. phureja</i> x <i>S. stenotomum</i>	3, 5, 11 and 12	QTL_ <i>phu-stn</i>	Wickramasinghe <i>et al.</i> (2009); Costanzo <i>et al.</i> (2005)
<i>S. tuberosum</i> ssp. <i>andigena</i> x <i>S. phureja</i> x	2, 7, 9 and 12	Pi_QTL	Li <i>et al.</i> (2012)
<i>S. stenotomum</i> x <i>S. acaule</i> x			

<i>S. bulbocastanum</i>			
<i>S. tuberosum ssp. tuberosum x S. chacoense x</i>	1 to 12	Pi_QTL	Oberhagemann <i>et al.</i> (1999)
<i>S. kurtzianum x S. stenotomum x S. ver</i>			
<i>S. tuberosum ssp. tuberosum x S. chacoense x</i>	3, 4, 5 and 10	Pi_QTL_	Sliwka <i>et al.</i> (2007)
<i>S. verrucosum x S. microdontum x</i>			
<i>S. gourlayi (2x/2EBN; 4x/4EBN) x</i>			
<i>S. yungasense (2x, 3x)*</i>			

Fuente: Tiwari *et al.* (2013)

CAPS, cleaved amplified polymorphic sequence; MAS, marker-assisted selection; NBS, nucleotide-binding site; SCAR, sequence-characterized amplified region; QTL, quantitative trait loci.

Tabla 4: Genes de Resistencia (R) y genes QTL identificados en varias especies de *Solanum*.

Cromosoma	Genes R	Especies de <i>Solanum</i>
IV	<i>R2</i>	<i>S. demissum</i>
	<i>Rpi_edn1.1, Rpi_edn1.2</i>	<i>S. × edinense</i>
	<i>Rpi_snk1.1, Rpi_hjt1.1, Rpi_hjt1.2, Rpi_hjt1.3</i>	<i>S. schenckii x S. hjertingii</i>
	<i>R2_like, Rpi_abpt</i>	?
	<i>Rpi_blb3</i>	<i>S. bulbocastanum</i>
	<i>Rpi_blb3</i>	<i>S. microdontum</i>
V	<i>R1</i>	<i>S. demissum</i>
VI	<i>Rpi_blb2</i>	<i>S. bulbocastanum</i>
VIII	<i>RB/Rpi_blb1</i>	<i>S. bulbocastanum</i>
	<i>Rpi_sto1, Rpi_pto1</i>	<i>S. stoloniferum = S. papita</i>
	<i>Rpi_bt1</i>	<i>S. bulbocastanum</i>
?	<i>RBver</i>	<i>S. verrucosum</i>
IX	<i>Rpi_vnt1.1, Rpi_vnt1.2, Rpi_vnt1.3</i>	<i>S. venturii</i>
	<i>R8, Rpi_Smira2</i>	<i>S. demissum</i> , cv. Sarpo Mira
	<i>R9a, Rpi_edn1.2</i>	<i>S. demissum</i> , <i>S. × edinense</i>
	<i>R9b</i>	<i>S. demissum</i>
XI	<i>R3a</i>	<i>S. demissum</i>
	<i>Rpi_sto2</i>	<i>S. stoloniferum</i>
	<i>R3b</i>	<i>S. demissum</i>
	<i>Rpi_Smira1</i>	<i>S. demissum</i> , cv. Sarpo Mira
XII	<i>R4Ma, R4B</i>	<i>S. demissum</i>

Fuente: Khavkin (2015)

Selección Asistida por marcadores moleculares (MAS)

Hasta la fecha muchos marcadores han sido mapeados en papa (<http://solgenomics.net/breeders/index.pl> and Hirsch *et al.* (2014)), pero relativamente pocos han sido exitosamente utilizados en programas MAS (marker-assisted selection), probablemente debido al genoma altamente heterogéneo de la papa. En las tablas 5 y 6 se presentan marcadores que han sido utilizados efectivamente para identificar los rasgos de interés en papa.

Tabla 5: Marcadores que han sido utilizados exitosamente en estudios para la identificación de genes de resistencia a *P. infestans* en papa.

Gen	Chr.	Especie/ variedad de papa	Nombre del marcador	Tipo de marcador	Resistencia	Referencia
<i>RB</i>	VIII	<i>S. tuberosum</i> = <i>S. bulbocastanum</i> somatic hybrids	RB	PCR basal	<i>P. infestans</i> (resistance to all races of <i>P. infestans</i>)	(Colton <i>et al.</i> 2006)
Unk	VI	<i>S. tuberosum</i> with <i>S. vernei</i>	GP 76	CAPS	<i>P. infestans</i>	(Gebhardt <i>et al.</i> 2004; Oberhagemann <i>et al.</i> 1999)
Unk	unk	<i>S. tuberosum</i>	NBS2_8	NBS	<i>P. infestans</i>	(Gebhardt 2011; Malosetti <i>et al.</i> 2007)
Unk	unk	<i>S. tuberosum</i>	NBS5a6_10	NBS	<i>P. infestans</i>	(Gebhardt 2011; Malosetti <i>et al.</i> 2007)
<i>Rpi-smiral</i>	XI	<i>S. tuberosum</i>	45/X1	PCR	<i>P. infestans</i>	(Tomczyńska <i>et al.</i> 2014)
<i>R1</i>	V	<i>S. tuberosum</i>	AFLP1	AFLP	<i>P. infestans</i>	(Kuhl 2011; Meksem <i>et al.</i> 1995)
<i>R1</i>	V	<i>S. tuberosum</i>	AFLP2	AFLP	<i>P. infestans</i>	(Meksem <i>et al.</i> 1995)
<i>R1</i>	V	<i>S. tuberosum</i>	GP21	RFLP	<i>P. infestans</i>	(Leonards-Schippers <i>et al.</i> 1992)
<i>R1</i>	V	<i>S. tuberosum</i>	BA47f2	PCR based	<i>P. infestans</i>	(Gebhardt <i>et al.</i> 2004)
<i>R1</i>	V	<i>S. tuberosum</i>	R11400	PCR based	<i>P. infestans</i>	(Ballvora <i>et al.</i> 2002; Gebhardt <i>et al.</i> 2004; Mori <i>et al.</i> 2011)
<i>R1</i>	V	<i>S. tuberosum</i>	R11800	PCR based	<i>P. infestans</i>	(Ballvora <i>et al.</i> 2002; Gebhardt <i>et al.</i> 2004; Mori <i>et al.</i> 2011)
<i>R2</i>	IV	<i>S. tuberosum</i>	R2-800	PCR based	<i>P. infestans</i>	(Mori <i>et al.</i> 2011)
<i>R2</i>	IV	<i>S. tuberosum</i>	ACC/CAT-535, ACT/CAC-189, AGC/CCA-369	AFLP	<i>P. infestans</i>	(Li <i>et al.</i> 1998)
<i>R3</i>	XI	<i>S. tuberosum</i>	TG105a, GP185, GP250(a)	RFLP	<i>P. infestans</i>	(El-Kharbotly <i>et al.</i> 1994)
<i>R6, R7</i>	XI	<i>S. tuberosum</i>	185(a), GP250(a)	RFLP	<i>P. infestans</i>	(El-Kharbotly <i>et al.</i> 1996)
Resistance hotspot	V	<i>S. tuberosum</i>	GP179	PCR based	<i>P. infestans</i>	(Gebhardt <i>et al.</i> 2004; Meksem <i>et al.</i> 1995)
Resistance hotspot	V	<i>S. tuberosum</i>	CosA	PCR based	<i>P. infestans</i>	(Gebhardt <i>et al.</i> 2004)
<i>Rpi-ber</i>	X	<i>S. berthaultii</i>	mCT240	ESTS	<i>P. infestans</i>	(Rauscher <i>et al.</i> 2006)
<i>Rpi-ber1, Rpi-ber2</i>	X	<i>S. berthaultii</i>	CT214	PCR based or CAPS	<i>P. infestans</i>	(Park <i>et al.</i> 2009; Rauscher <i>et al.</i> 2006)
<i>Rpi-blb3</i> (may be allelic to <i>R2</i>)	IV	<i>S. bulbocastanum</i>	Th21	PCR based	<i>P. infestans</i>	(Jacobs <i>et al.</i> 2010; Park <i>et al.</i> 2005)
<i>Rpi-moc1</i>	IX	<i>S. mochiquense</i>	TG328	CAPS	<i>P. infestans</i>	(Smilde <i>et al.</i> 2005)
<i>Rpil</i>	VII	<i>S. pinnatisectum</i> × <i>S. cardiophyllum</i> , BC to <i>S. cardiophyllum</i>	TG20A	RFLP	<i>P. infestans</i>	(Kuhl <i>et al.</i> 2001)
<i>Rpl-ber</i>	X	<i>S. tuberosum</i> × <i>S. berthaultii</i> BC <i>S. tuberosum</i>	TG63	RFLP	<i>P. infestans</i>	(Ewing <i>et al.</i> 2000)
<i>Rpi-phul</i>	IX	<i>S. tuberosum</i> hybrids	GP94	PCR	<i>P. infestans</i>	(Śliwka <i>et al.</i> 2010; Śliwka <i>et al.</i> 2006; Śliwka <i>et al.</i> 2008)

Fuente: Ramakrishnan, Ritland, Blas, & Riseman, 2015

Tabla 6: Marcadores moleculares asistidos para identificar genes de resistencia R y QTL en papa.

Gene/QTL	Chr.	Primer	Tipo de marcador	Secuencia de primer	Referencias
<i>R1</i>	5	R1-1205	SCAR	CACTCGTGACATATCCTCACTA GTAGTACCTATCTTATTTTC TGCAAGAAT	Sokolova <i>et al.</i> (2011)
		BA47f2	SCAR	TAACCAACATTATCTTCTTTGCC GAATTTGGAGAGGGGTTTGCTG	Gebhardt <i>et al.</i> (2004)
		CosA	SCAR	CTCATTCAAAAATCAGTTTTGATC GAATGTTGAATCTTTTTGTGAAGG	Gebhardt <i>et al.</i> (2004)
		R1F/R (76-2sf2/ 76-2SR)	AS	CACTCGTGACATATCCTCACTA CAACCCTGGCATGCCACG	Ballvora <i>et al.</i> 2002,
		GP76	SCAR	ATGAAGCAACACTGATGCAA TTCTCCAATGAACGCAAACCT TTCTGCTGATACTGACT	Oberhagemann <i>et al.</i> (1999)
		SPUD237 (AluI)	CAPS	AGAAAACC AGCCAAGGAAAAGCTAGCATCCAAG	De Jong <i>et al.</i> (1997)
		GP21 (AluI)	CAPS	AGTGAGCCAGCATAGCATTACTTG GGTTGGTGGCCTATTAGCCATGC	De Jong <i>et al.</i> (1997)
		GP179	SCAR	GGTTTTAGTGATTGTGCTGC AATTTCCAGACGAGTAGGCACT	Meksem <i>et al.</i> (1995)
		R3-1380	SCAR	TCCGACATGTATTGATCTCCCTG AGCCACTTCAGCTTCTTAC AGTAGG	Sokolova <i>et al.</i> (2011)
		<i>R3 (R3a & R3b)</i>	11	SHa-F/SHa-R	AS
R3bF4/R3bR5	AS			ACCAGTTTCTTGCAATTCAGATTG AATCAAATTATCCACCCCAA CTTTTAAAT	Rietman (2011)
<i>RB/Rpi-blb1</i>	8	RB-629/638	SCAR	CAAGTATTGGGAGGACTGAAAGGT ATGGCTGAAGCTTTCATTCAAGTTCTG	Sokolova <i>et al.</i> (2011)
		RB-1223	SCAR	CAAGTATTGGGAGGACTGAAAGGT CACGAGTGCCCTTTTCTGAC	Pankin <i>et al.</i> (2011)
		CT88 (Primer 1/primer 1')	SCAR	ACAATTGAATTTTTAGACTT GCTCCTGATACGATCCATG	Colton <i>et al.</i> (2006)
<i>Rpi-abpt</i>	4	R2-F1/R2-R3	AS	ACGGCTTCTTGAATGAA AGGATTTTCAGTATGTCTCG	Kim <i>et al.</i> (2012)
		Th2	CAPS	TCCATTGTTGATTGCCCT GAACGCGAAAGAGTGTGATAG	Park <i>et al.</i> (2005b)
<i>Rpi-ber1</i>	10	CT214 (DdeI)	CAPS	CCCCTGCTATGGAGAGT TCCAATTGCCAGACGAA	Tan <i>et al.</i> (2010)
		TG63 (Bme1390I)	CAPS	TAGAGAAGGCCCTTGTAAAGTTT ATCATCTCTCAAAGAATCAAG	Tan <i>et al.</i> (2010)
		Q133	SCAR	ATCTCCCCATTGACAACCAA GCTGAACGCTATGAGGAGATG	Tan <i>et al.</i> (2010)
<i>Rpi-mcd1</i>	4	TG339 (MnlI)	CAPS	TGAGGTTATCACGCAGAATTG	Tan <i>et al.</i> (2010)
<i>Rpi-phu1</i>	9	GP94 (OPB07 + TG/GT)	RAPD	GAAACGGGTG + TG/GT	_Sliwka <i>et al.</i> (2006)
		OPA17	RAPD	GACCGCTTGT	Wickramasinghe <i>et al.</i> (2009)
<i>QTL_phu-stn</i>	3	OPA03	RAPD	AGTCAGCCAC	Wickramasinghe <i>et al.</i> (2009)
		GP198F/R	AS	TTTGCTTACTCTTGTGTATG TCACTTTGGTGCTTCTGTGC GTGGAACGCCGTCCATCCTTAG	Wickramasinghe <i>et al.</i> (2009)
<i>Rpi-stol</i>	8	Ssto-448	SCAR	TGCATAGTGGTTAGATGTA TGTTTGATTA	Sokolova <i>et al.</i> (2011)
<i>Rpi-avl1</i>		N2527	AS	GAAACACAGGGGAATATTCACC CCATRTCTTGWATTAAGTCATGC	Verzaux (2010)
<i>Rpi-cap1</i>	11	CP58 (MspI)	CAPS	ATGTATGGTTCGGGATCTGG TTAGCACCAACAGCTCCTCT	Jacobs <i>et al.</i> (2010)

<i>Rpi-dlc1</i>	9	GP101 (AluI)	CAPS	GGCATTCTATGGTATCAGAG GCTTAACATGCAAAGGTTAAA	Golas <i>et al.</i> (2010)
		S1d5-a	AS	CGCCTCTTTCTCTGAATTC GATCTGGGATGGTCCATTC	Golas <i>et al.</i> (2010)
<i>Rpi-mcql</i>	9	TG328 (AluI)	CAPS	AATTAATGGAGGGGGTATC GTAGTATTCTAGTTAAACTACC	Smilde <i>et al.</i> (2005)
<i>Rpi-snk1.1</i> and <i>Rpi-snk1.2</i>	4	Th21 (MboI)	CAPS	ATTCAAAATTCTAGTTCCGCC AACGGCAAAAAGCACCAC	Jacobs <i>et al.</i> (2010)
<i>Rpi-ver1</i>	6	CD67 (HpyCH4IV, SsiI)	CAPS	CCCCTGCAAATCCGTACATA CCATACGAGTTGAGGGATCG	Jacobs <i>et al.</i> (2010)
<i>Rpi-vnt1.1</i>	9	TG35 (HhaI/XapI)	CAPS	CACGGAGACTAAGATTGAGG TAAAGGTGATGCTGATGGGG	Pel <i>et al.</i> (2009)
<i>Rpi-vnt1.3</i>	9	NBS3B	AS	CCTTCCTCATCCTCACATTTAG GCATGCCAACTATTGAAACAAC	Pel <i>et al.</i> (2009)

Fuente: Tiwari *et al.* (2013). CAPS, cleaved amplified polymorphic sequence; MAS, marker-assisted selection; NBS, nucleotide-binding site; SCAR, sequence-characterized amplified region; QTL, quantitative trait loci.

Para esta ocasión se utilizaron investigaciones previas como base para poder verificar la presencia los genes presentados en la **Tabla 7**.

Tabla 7: Genes que confieren resistencia a *P. infestans*.

Gen	Fuente	Crom.	Referencia
R1	<i>S. demissum</i>	V	Ballvora <i>et al.</i> , 2002
Rpi-phu1	<i>S. phureja x S.</i> <i>stenotomum</i>	IX	(Sliwka, Jakuezun, Kaminski, & Zimonch- Guzowska, 2010)
R3	<i>S. demissum</i>	XI	Huang, 2005
RB/Rpi-blb1	<i>S. Bulbocastanum</i>	VIII	J. Song <i>et al.</i> , 2003
Rpi-ber1	<i>S. Berthaultii</i>	X	Rauscher <i>et al.</i> , 2006

Fuente: Adaptado de Mosquera, Fernández, Martínez, Acuña, & Cuellar (2008)

2.10.6. Aplicaciones de la PCR

- **Amplificación de ADN:** Desde que la PCR se inventó ha tenido muchos usos ya que puede generar muchas copias de un fragmento de ADN específico antes de clonarlos (Figura 4), así se puede considerar un método efectivo si la secuencia a estudiar se conoce suficientemente a detalle para que sea posible limitar la secuencia de nucleótidos de dos cebadores complementarios. Por lo tanto, la utilidad especial se da en el caso de que haya poca cantidad de ADN pues se pueden generar grandes cantidades de ADN teniendo muestras pequeñas como las que se encuentran en una célula. Posteriormente se da una reacción en el termociclador donde se lleva a cabo la reacción de PCR propiamente dicha (Figura 5).

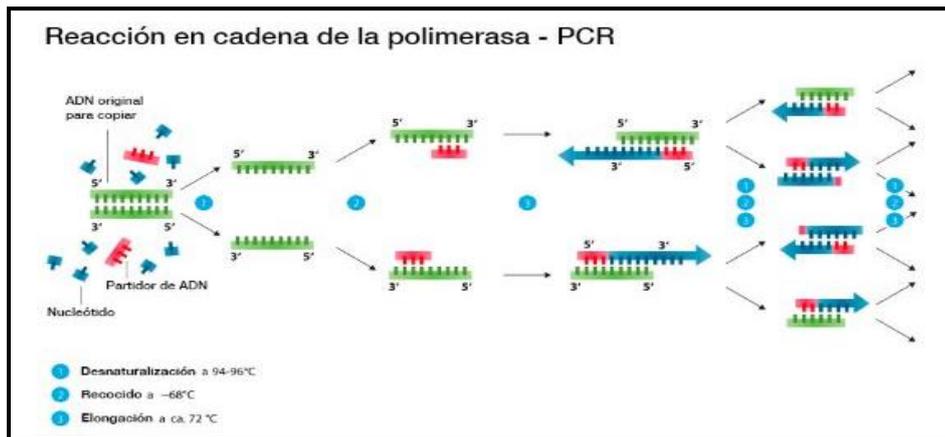


Figura 4: Reacción de Cadena de la Polimerasa (PCR) representada en cadenas sucesivas.
Fuente: Enzoklop (s.f.)

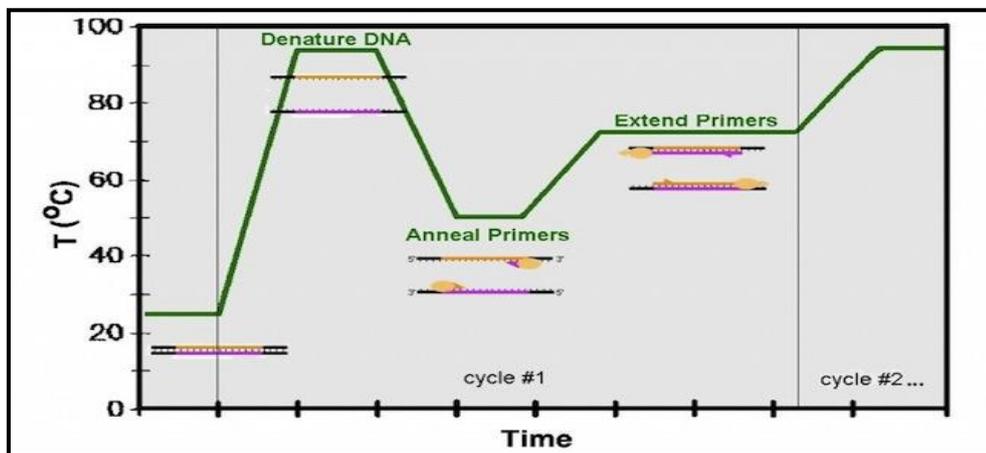


Figura 5: Relación entre el tiempo y la temperatura del termociclador.
Fuente: GenScript (2002)

- **Pruebas para la presencia de secuencias de ADN específicas:** Por ejemplo, para poder determinar una muestra de tejido con la presencia de algún virus, la técnica de PCR aísla ácido nucleico de la muestra y añade cebadores complementarios al ADN viral junto a otros reactivos. Finalmente, se da paso a la reacción y si la PCR da algún resultado se afirma la presencia del genoma viral en la muestra por medio de la hibridación de los cebadores con el virus. De lo contrario, si no hay resultado alguno se indica ausencia, así la PCR en este caso se aplica como sistema de detección.

- **Comparación de moléculas de ADN:** La PCR se realiza en muestras usando varios cebadores que son diseñados en forma específica o al azar. Si dos moléculas de ADN tienen la misma secuencia de bases, generarán los mismos productos de PCR en reacciones con cebadores idénticos, entonces mientras más similares son los productos de PCR, más similares son las secuencias de los genomas estudiados (Karp, 2010).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Ubicación del experimento

El procesamiento de datos y extracción de ADN se llevó a cabo en los laboratorios del Instituto de Biotecnología de La Universidad Nacional Agraria La Molina-Lima, Perú (Área de Genómica y Bioinformática) ubicado en las siguientes coordenadas:

Latitud: 12°04'40.1"S

Longitud: 76°56'37.6"O

Altitud: 238 msnsm.

3.2. Material vegetal

En este trabajo se utilizaron tubérculos colectados por agricultores, a su vez estos fueron caracterizados y provenían de Cajamarca, Cusco, Huancavelica, Huancayo y Puno. Estos mostraban tolerancia a heladas (Soriano, 2020).

Se sembraron 182 accesiones de *Solanum tuberosum* L. dispuestas en macetas identificadas con códigos en un vivero (cobertor) ubicado en Sicaya (Huancayo, Junín) con las siguientes coordenadas:

Latitud: -12°01'53" S

Longitud: -75°16'47" O

Altitud: 3276 msnm.

Las accesiones tuvieron el debido manejo y cuidado en las labores agronómicas. Para llevar las muestras al laboratorio se cortaron los tallos jóvenes con el fin de obtener buena calidad de ADN ya que hay poca cantidad de agentes contaminantes presentes en las etapas más jóvenes.

Los tallos colectados tuvieron 4 meses de crecimiento después de haber sembrado las plantas. Luego, se envolvieron en papeles toalla húmedos para ser trasladadas al IBT-UNALM y conservadas a -4 °C para poder continuar con el proceso de extracción de ADN.

3.3 Materiales y equipos

Recolección de material

- Recipiente de conservación de muestras frescas (Cooler o Caja de Tecnopor)
- Bolsas con hielo
- Papel toalla
- Pizetas o aspersores para humedecer
- Agua mineral
- Plumones / etiquetas
- Tijera desinfectada
- Tejido joven (hojas tiernas)

Equipos

- Baño de María con indicador digital EW-12122-X1
- Autoclave
- Centrifuga Multifuge 3 L-R
- Refrigeradora
- NanoDrop One^c
- Transiluminador UVsolo TS Imaging System
- Estufa
- Equipo de Electroforesis
- Balanza (En gramos)
- Termociclador Mastercycler Nexus Gradient 96 –Eppendorf

Reactivos químicos

- Buffer CTAB 2X (700 µl x 200 unidades =140 ml.)
- B-Mercaptoetanol (2 µl X 200 unidades= 400 µl)
- Cloroformo/alcohol isoamílico (24:1) (700 µl x 200 unidades x 2 =280 ml.)

- Tampón CTAB 10X (50x200 μ l = 10 ml.)
- Etanol al 70% para lavar (100 ml.)
- Etanol al 95% (100 ml.)
- Isopropanol frío (100 ml.)
- Buffer T10E1 o agua destilada (80 μ l x 200 unidades=16 ml).
- Marcador Ladder para ADN
- Marcador de peso molecular Lambda DNA/HindIII Marker
- Bromuro de Etidio
- Salb 1X
- EDTA 0.5 M y 1M

Materiales de laboratorio

- Morteros pre-enfriados
- Nitrógeno líquido
- Tubos Eppendorf – 1.5 ml
- Contenedores de cloroformo/alcohol isoamílico restante
- Puntas esterilizadas para micropipetas
 - Amarillas: 2-200 μ l
 - Azules: 100-1000 μ l
 - Transparentes: 1-10 μ l
- Micropipetas regulables
- Papel aluminio
- Agarosa
- Placas y peines para unidades de electroforesis
- Matraces 250 ml
- Guantes
- Placas para PCR
- Agua destilada (Agua MiliQ)

3.4. Metodología

A. Selección de marcadores

Estudios previos dieron como referencias a marcadores ya utilizados en investigaciones relacionadas a genes que demuestran resistencia al tizón tardío como prueba de avances y nuevos descubrimientos o teorías en diferentes laboratorios y sitios experimentales a nivel mundial.

El marcador 76-2SF2/76-2SR (Phy 13) fue analizado en el diagnóstico molecular para detectar el alelo R1 en el SPPBI (State Priekuļi Plant Breeding Institute).

Con el marcador GP94 (Phy 14) se registraron genes en híbridos de papa y este fue seleccionado para probar el gen de resistencia Rpi-phu1 al tizón tardío que fue localizado en la distancia de 6.4 cM. en el respectivo estudio.

De otro lado, el marcador 45/XI (Phy 15) fue elegido como el mejor entre 11 marcadores del cromosoma XI de acuerdo al mapa genético de Sarpó Mira porque demostró el mayor acoplamiento para la resistencia en el locus con una precisión entre el 55.8% y 67.9%. Mientras tanto, CT88 (Phy 16) fue probado en estudios previos y las amplificaciones obtenidas fueron relacionadas a Rpi-blb1 en *Solanum bulbocastanum*, especie muy investigada por el pool de genes resistentes a *P. infestans*.

Por último, el marcador CT214 (Phy 17) fue altamente enlazado a los genes Rpi-ber para MAS ya que se demostró su efecto en la pirámide de Rpi-ber y Rpi-mcd1.

Los cebadores mencionados se encuentran en la Tabla 8. Además, estos iniciadores fueron escogidos debido a su buena relación/eficiencia con los genes resistentes a *Phytophthora infestans* ya antes presentados en la Tabla 7.

Tabla 8: Primers reportados anteriormente para resistencia a *P. infestans* (Mont. De Bary)

Gen	Nombre del marcador		Primer	Pb (pares de bases)	Referencias
	Phy 12*	F	CAC ATA TCC AGC ATC CTT AAA	nn	Ritter (2019) Comunicación personal
		CC			
		R	TGA CTG GGA TGA GAA GTG GA		
R1	76-2SF2 (Phy 13)	F	CAC TCG TGA CAT ATC CTC ACT A	1353	Ballvora <i>et al.</i> (2002)
	76-2SR	R	CAA CCC TGG CAT GCC ACG		
Rpi-phu 1	GP94 (Phy 14)	D	ATG TAT CAC AAT CAC ATT CTT GCT C	350	Sliwka <i>et al.</i> (2010)
		R	TGT AAA ACC AAC AAG TAG TGT TGC		
R3	45/XI (Phy 15)	F	AGA GAG GTT GTT TCC GAT AGA CC	900-1500	Tomczynska <i>et al.</i> (2014)
		R	TCG TTG TAG TTG TCA TTC CAC AC		
RB/Rpi-blb1	CT88 (Phy 16)	F	CAC GAG TGC CCT TTT CTG AC	332	Colton <i>et al.</i> (2006)
		R	ACA ATT GAA TTT TTA GAC TT		
Rpi-ber1	CT214 (Phy 17)	F	GAACGCGAAAGAGTGCTGATAG	100-200	Tan <i>et al.</i> (2010)
		R	CCCCTGCCTATGGAGAGT		

*Phy 12 denominado en este estudio. Fuente: Elaboración Propia

Adicionalmente a estos marcadores previamente publicados se han utilizados otros 34 alelo específicos del Dr.

Enrique Ritter (comunicación personal) del Instituto NEIKER de España en el proyecto denominado **PAPA CLIMA- Marker assisted selection for potato germplasm adapted to biotic and abiotic stressed caused by global climate change**. Los primers están descritos en la Tabla 9.

Tabla 9: Datos Forward y Reverse de los primers utilizados en una segunda ronda de prueba.

	Nombre	Orientación	Secuencia del Primer
1	ASP3-1F	FORWARD	ATGGAATTCAGCCCAATCAA
2	ASP3-1R	REVERSE	ACAATATTCTCCGTCATGAAAA
3	ASP3-2F	FORWARD	TCCCAGTTTCTGGACTGCAT
4	ASP3-2Ra	REVERSE	GAGACCAGCTCGAAGTGTTATCTAC
5	ASP3-2Rb	REVERSE	GAGACCAGCTCGAAGTGTTATCTAT
6	ASP3-4 F	FORWARD	CCCTGCATTCTTGAAATGGT
7	ASP3-4 Ra	REVERSE	GCACCAGGATCAGCACCT
8	ASP3-4 Rb	REVERSE	CACCAGGATCAGCACCG
9	ASP3-5 F	FORWARD	TCCCAACATTCAACCTCCAT
10	ASP3-5 Ra	REVERSE	CAATGAAGAGAAAAAAACAAACGAT
11	ASP3-5 Rb	REVERSE	CAATGAAGAGAAAAAAACAAACGAG
12	ASP3-7 F	FORWARD	TTTTCAAATCCCCAAAGGGT

13	ASP3-7 R	REVERSE	TTGAAGTATTTGGGCAGCAA
14	ASP3-9 Fa	FORWARD	GAAAATCTAAGGCTCAATGTTTCGT
15	ASP3-9 Fb	FORWARD	AAATCTAAGGCTCAATGTTTCGC
16	ASP3-9 R	REVERSE	CAAGTGCACAAATCCTGCTG
17	ASP3-3 Fa	FORWARD	GAAAATATAGAAGAAAGGGGTTTGTG
18	ASP3-3 Fb	FORWARD	TGAAAATATAGAAGAAAGGGGTTTGTGTA
19	ASP3-3 R	REVERSE	GGATAATTATGTTGGAGTTGAGTCG
20	ASF3R-3 Fa	FORWARD	AAAATAGCAAAAATTGCACCAAG
21	ASF3R-3 Fb	FORWARD	AAAATAGCAAAAATTGCACCAAC
22	ASF3R-3 R	REVERSE	GTAGCTGCCGTTGTTGATGA
23	ASF3-1 Fa	FORWARD	TCTGGTGAGGGCTTTACGTTAT
24	ASF3-1 Fb	FORWARD	TCTGGTGAGGGCTTTACGTTAC
25	ASF3-1 R	REVERSE	ATTCTGCAAACCGAGGGATA
26	ASF3-2 F	FORWARD	CATGGATCCTTCCTCAACGA
27	ASF3-2 R	REVERSE	GCCACCCTACAATCCCTTCT
28	ASF3-3 F	FORWARD	GTGCGCAGGGTTACTGACTT
29	ASF3-3 Ra	REVERSE	AGATCAATCTCTCTAAAGTGTGAATAACTA
30	ASF3-3 Rb	REVERSE	AGATCAATCTCTCTAAAGTGTGAATAACTG
31	ASF3-4 Fa	FORWARD	CCTGGTACAGGGGATGTACG
32	ASF3-4 Ra	REVERSE	TCCACCAAGCAACAACAGTG
33	ASF3-4 Fb	FORWARD	TGCTGTGGTCTTACAATGTGGT
34	ASF3-4 Rb	REVERSE	GCCAGACAAGGAATCTGCT

B. Tamizado de iniciadores seleccionados para resistencia al tizón tardío

Para la realización de esta etapa se ejecutó el siguiente procedimiento:

3.4.1. Extracción de ADN

Método de Doyle & Doyle (1990) adaptado al IBT- UNALM.

Las hojas más jóvenes de los tallos con buenas condiciones fueron utilizadas para la extracción de ADN de cada accesión. Para ello se utilizaron 300 mg de hojas frescas lo cual representó alrededor de 100 µg de ADN total.

Protocolo:

1. Pulverizar con Nitrógeno líquido el tejido foliar colectado de hojas jóvenes y separar 200 mg (Figura 6-A).
2. Transferir el polvo a un tubo Eppendorf de 1.5 ml. para agregar 700 µl. de tampón **CTAB 2X** y 2 µl. de **B-mercaptoetanol**, mezclar todo agitando suavemente. Incubar las muestras a 65°C en baño María durante 30 min.
3. Retirar las muestras de la incubadora y dejar reposar a temperatura de ambiente por 2 min.
4. Agregar 700 µl de cloroformo/ alcohol isoamílico (24:1) a cada tubo. Mezclar suavemente para no dañar el ADN y centrifugar las muestras durante 5 min a 14000

- RPM. Luego, transferir el sobrenadante a otro tubo sin dejar pasar la interfase. Finalmente, descartar el cloroformo/ alcohol isoamílico remanente en contenedores.
5. Agregar 50 μ l. de tampón CTAB (10X) (en NaCl 0.7 M), agitar suavemente hasta obtener una mezcla uniforme.
 6. Adicionar 700 μ l de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1), mezclar suavemente y centrifugar 5 min a 14 000 rpm. Transferir el sobrenadante a otro tubo.
 7. Agregar 500 μ l de Isopropanol frío a cada tubo. Invertir los tubos varias veces y dejarlos incubando a -20°C durante 40 min. (Figura 6- B)
 8. Centrifugar las muestras a 12 000 RPM durante 20 min. y eliminar cuidadosamente el sobrenadante. Dejar que el precipitado se seque invirtiendo los tubos abiertos durante 2 minutos.
 9. Lavar el precipitado de ADN en 500 μ l. de etanol al 70% (por 3 min), centrifugar las muestras a 12 000 RPM durante 20 min. y descartar con cuidado el etanol.
 10. Agregar 500 μ l. de etanol al 95%. Centrifugar las muestras a 12 000 RPM durante 20 min para eliminar el etanol después. (Figura 6-C,D)
 11. Dejar el precipitado secar por dos o más horas con los tubos abiertos de forma invertida.
 12. Disolver el precipitado de ADN en 80 μ l de buffer T10E1 o agua destilada (Agua MiliQ) y almacenar a -20°C . (Figura 6- E)

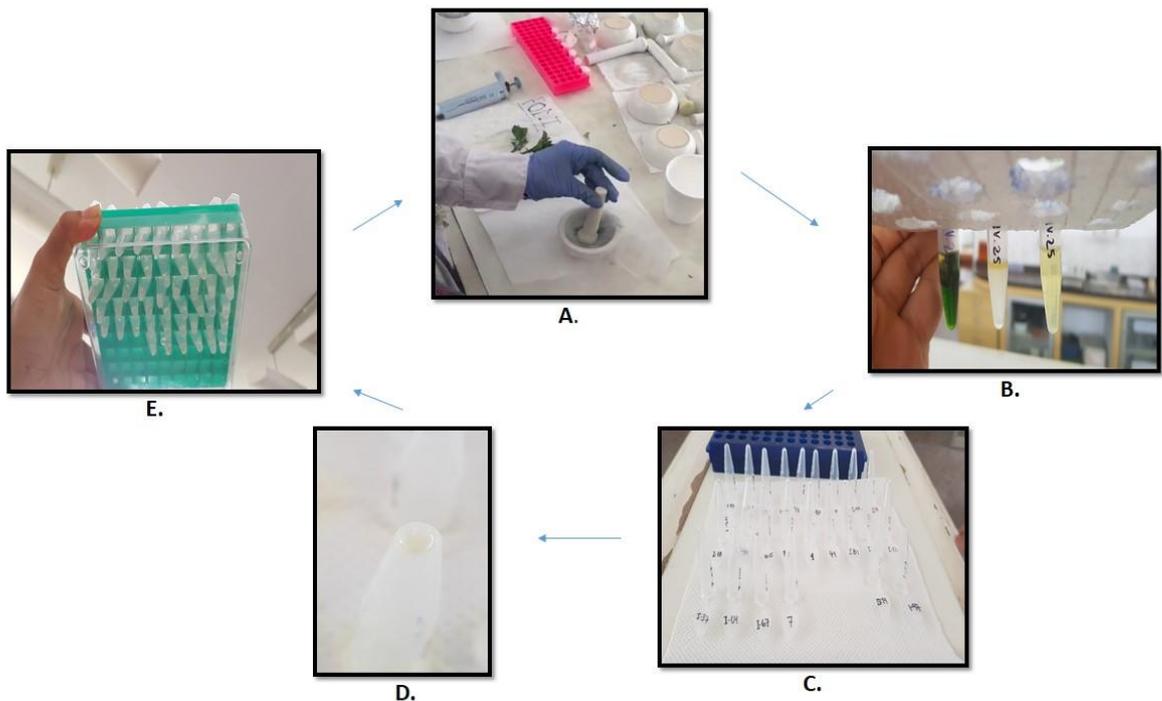


Figura 6. Esquema del proceso protocolar de extracción de ADN

3.4.2. Calidad de ADN (Electroforesis horizontal)

La calidad del ADN se determinó por análisis comparativos de muestras teñidas con Bromuro de Etidio en geles de agarosa, donde se forma un complejo con el ADN que al ser expuesto a la luz UV emite fluorescencia. Para ello se toman 2 μ l de muestra extraída con 8 μ l de tampón de carga SALB 1X y se carga a un gel de agarosa al 1%. La corrida electroforética se realiza a 100 voltios por 30 minutos utilizando como tampón de corrida TBE 1X, luego se captura la imagen mediante una caja que emite luz ultravioleta para dar como resultado la visibilidad del ADN en bandas de las muestras cargadas (Anexo 2).

3.4.3. Cantidad de ADN

Con la máquina NanoDrop One^c se proporcionaron los siguientes valores:

- **Concentración de ácidos nucleicos.** Se proporciona en la unidad seleccionada, en este caso ng/ μ l. Los cálculos se basan en variaciones de la ecuación de la ley de Beer que usa el valor de absorbancia de ácidos nucleicos corregidos a 260 nm, el factor utilizado y el camino óptico de la muestra.
- **Absorbancia a 260 nm, 280 nm y en ocasiones a 230 nm.** Estos valores se utilizan para calcular índices de pureza de los ácidos nucleicos medidos. Dichos índices son sensibles a la presencia de contaminantes en la muestra, como los disolventes y reactivos residuales que se utilizan normalmente en la purificación de la muestra.

3.4.4. PCR para la detección de genes candidatos de tolerancia a *P. infestans*

- a) **Preparación para la amplificación en PCR:** Los alelos de interés relacionados a resistencia fueron seleccionados por los primers ya descritos enviados a secuenciar. La amplificación se llevó a cabo con la cantidad de 2 μ l de ADN y 8 μ l de una mezcla maestra o base llamada “Mastermix” (ver Tabla 10) con distintos reactivos en los tubos Eppendorf de cada especie. La distribución de los reactivos se realizó en base a la cantidad de concentraciones que se debían de probar al inicio y determinar una cantidad grande que luego sea distribuida en cada uno de los Tubos a amplificar. En esta ocasión teniendo como base la cantidad de cada componente para una reacción, se puede hacer el cálculo para otras mediante una simple multiplicación. Sin embargo, se debe tomar en cuenta hacer una o dos medidas más agregadas al total de las reacciones a amplificar porque hay material que suele ir quedándose en el tubo y en la pipeta cada vez que se retira lo que provoca que las últimas muestras queden sin suficiente cantidad de mezcla.

Tabla 10: Cantidad de reactivos a utilizar (μl) en las mezclas para una, cuatro y cinco reacciones de amplificación en PCR.

MASTERMIX	1RX (μl)	4RX (μl)	5RX (μl)
H₂O Ultra pura	4.6	18.4	23
10X Standard Taq Reaction Buffer	1	4	5
MgCl₂ 25 mM	1	4	5
DNTP's	0.4	1.6	2
F	0.4	1.6	2
R	0.4	1.6	2
Taq	0.2	0.8	1
Total de contenido (μl)	8	32	40

b) Proceso en el termociclador

La reacción que se lleva en esta parte se conoce como reacción en cadena de la polimerasa (PCR). El procedimiento básico de este protocolo emplea una polimerasa de ADN termoestable llamada polimerasa *Taq* aislada de *Thermus aquaticus*, una bacteria de manantiales calientes a temperaturas mayores de 90°C. El inicio de la reacción se da con la mezcla de ADN, la alícuota de *Taq* y los cuatro desoxirribonucleótidos junto a una gran cantidad de dos fragmentos sintéticos cortos de ADN conocidos como oligonucleótidos que son complementarios de las secuencias de ADN en los extremos 3' de la región del ADN que va a amplificarse. Los oligonucleótidos sirven como iniciadores o cebadores a los que se agregan los nucleótidos durante los siguientes pasos de replicación. Luego, la mezcla se calienta a 95°C, una temperatura tan caliente que hace que las moléculas de ADN se separen en dos cadenas. A continuación, la mezcla se enfría hasta llegar a la temperatura específica de cada primer (Temperatura de anillamiento) y se unan con las cadenas de ADN blanco. La temperatura se sube nuevamente hasta 72°C, así la polimerasa termofílica agrega nucleótidos al extremo 3' de los cebadores.

A medida que la polimerasa extiende el cebador, copia selectivamente el ADN blanco y forma nuevas cadenas de ADN complementario. La temperatura se eleva de nuevo para que las cadenas de ADN recién formadas y las originales se separen. Seguidamente la muestra se enfría para que los cebadores sintéticos se unan de nuevo con el ADN blanco, que ahora está en una cantidad dos veces mayor que la del inicio. El ciclo se repite 35 veces y en cada ronda se duplica la cantidad de la región específica de ADN limitada por los cebadores unidos. Se pueden generar billones de copias de la región específica en

estudio en tan sólo pocas horas con un generador de ciclos térmicos que tiende a cambiar la temperatura de la mezcla en reacción de forma automática para hacer posible que ocurra cada paso del ciclo.

c) Pruebas de temperatura de anillamiento para cada primer

Cada primer necesita una temperatura específica de anillamiento en la cual la parte de ADN que se desea encontrar es mucho más fácil de ubicar en medio de la reacción.

Usualmente el promedio normal de las temperaturas oscila entre 56°C y 58°C.

Tabla 11: Prueba de temperaturas de anillamiento para cada primer.

Nombre del marcador	Temperatura de anillamiento en la prueba
Phy 12*	56° C
76-2SF2 (Phy 13) 76-2SR	56° C
GP94 (Phy 14)	58 °C
45/XI (Phy 15)	58° C
CT88 (Phy 16)	58° C
CT214 (Phy 17)	58° C

3.5. Análisis Estadístico

No hubo un diseño estadístico en este experimento. Se intentó realizar la verificación de presencia o ausencia de los marcadores en las accesiones estudiadas mediante la **estadística descriptiva** y el Programa Excel para la filtración de datos. Luego se propuso ver la discriminación de los iniciadores.

La moda y media también habrían sido tomadas en cuenta para clasificar a las accesiones por la cantidad de veces que los individuos se presentaban indicando resistencia a *P. infestans*, considerándolos, así como accesiones promisorias.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1. Pruebas preliminares de las primeras 96 muestras con el iniciador Phy 12

Después de retirar las muestras del termociclador, se eligieron algunas en orden desde I-01 hasta I-50 (Figura 7) con el propósito de ver si había discriminación o no entre los individuos del ensayo y por lo tanto la eficiencia de Phy 12 en esta parte inicial. El resultado de estos individuos elegidos y el iniciador fueron considerados para poder ir midiendo el progreso de la evaluación en general y a la vez realizar algunos cambios necesarios sin desperdiciar el siguiente material a evaluar ya que tanto el uso excesivo como la exposición al ambiente del ADN hacen que este se degrade fácilmente. El marcador molecular (M) utilizado fue Ladder.

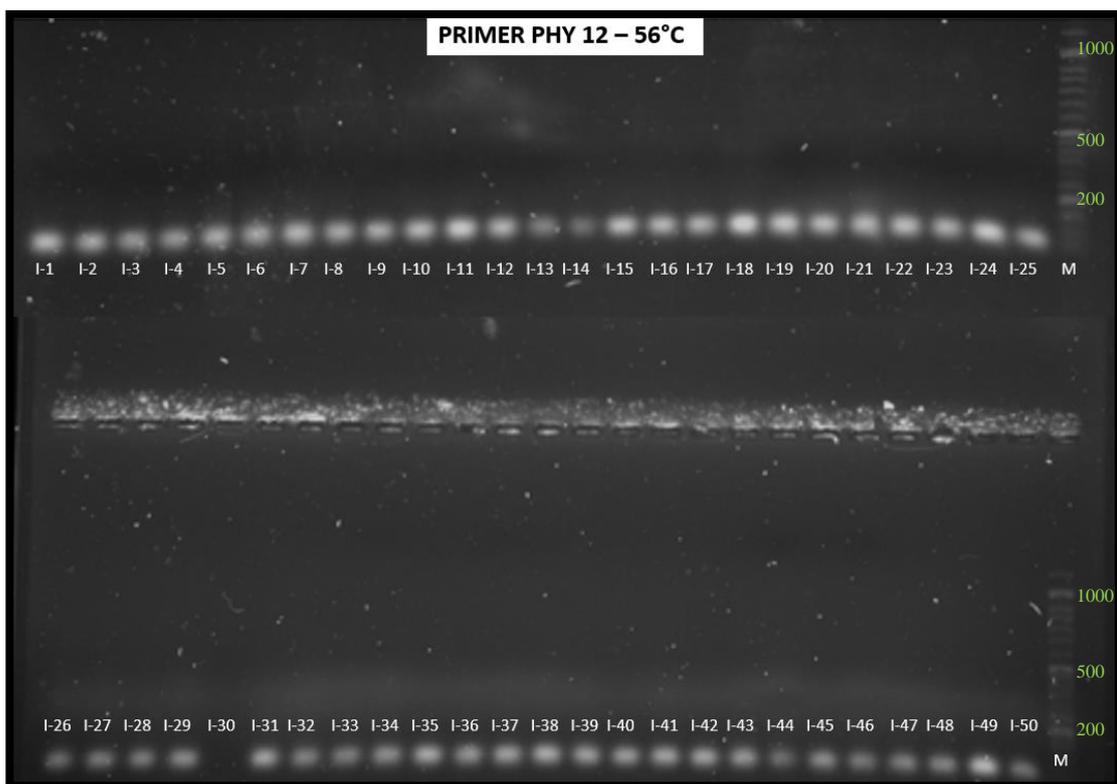


Figura 7: Gel con las amplificaciones de las primeras 50 muestras de toda la población y el primer Phy 12.

En este caso el primer Phy 12 (Ritter, comunicación personal- 2019) amplificó para todas las muestras a excepción de I-30 (que fue un caso de pérdida de carga de muestra en medio del buffer). Es decir, no hubo discriminación en la amplificación de resistentes y no resistentes. La discusión en esta parte se dará en conjunto con los siguientes resultados.

4.2. Pruebas preliminares con individuos resistentes y no resistentes

Posteriormente se seleccionaron unos pocos individuos clasificados como resistentes y no resistentes por conocimiento previo (Figura 8). Se utilizaron todos los primers en investigación, cada uno a la temperatura de anillamiento de 57°C de promedio con el objetivo de mostrar sólo si es discriminante o no hasta este punto.

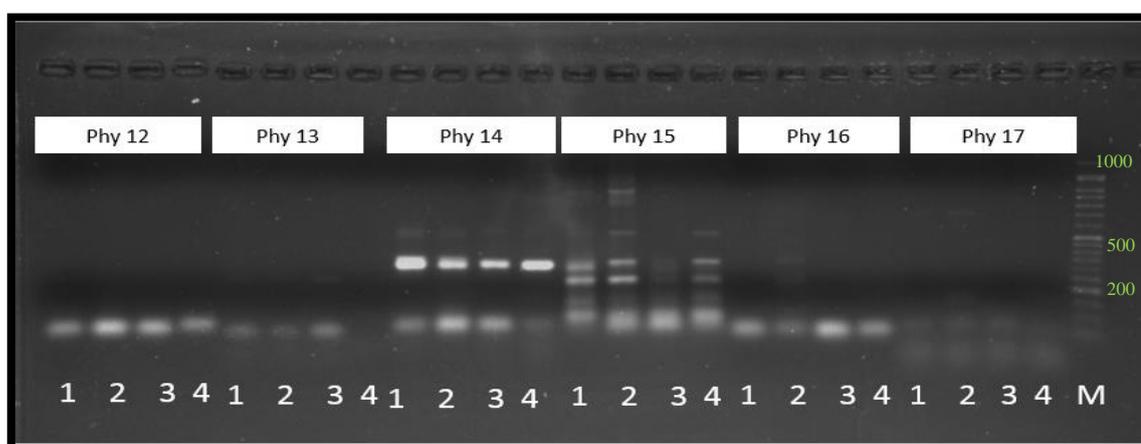


Figura 8: Screening de todos los primers con variedades resistentes y no resistentes. (1) I-02 Tolerante; (2) I-06 Tolerante; (3) I-14 Susceptible; (4) Yana Huayro Susceptible.

En general, todos los primers dieron como resultado la no discriminación entre individuos resistentes y susceptibles. Cabe resaltar que en el caso de Phy 17, aunque la amplificación sea difusa, los resultados no definieron si es que hubo discriminación en el proceso. Por lo tanto, se reporta el resultado de cada primer en investigaciones previas:

- **Phy 13-Iniciador 76-2SF2/ 76-2SR (Ballvora *et al.*, 2002)**

Este iniciador no estuvo entre el rango de pares de bases reportados anteriormente por Díaz M *et al.* (2003) con 1353 pb y Nadezhda *et al.* (2014) con 1399 pb lo cual debió causarse netamente por la cantidad de ADN de la muestra. Este marcador fue estudiado por Nadezhda *et al.* (2014) quienes obtuvieron un resultado de la alta tasa de detección de resistencia de dos híbridos derivados de *S. guerreroense*. Según Díaz M *et al.*, (2003) estos marcadores no discriminan debido a que no hay distinción entre los genes mayores

lo que sugiere que existen ciertos genes homólogos que dan como resultado la amplificación. Además, estos marcadores fueron efectivos en sus estudios probados con *Solanum phureja*.

Los resultados obtenidos en el germoplasma peruano fueron diferentes a los reportados por Díaz *et al.* (2003), probablemente debido a que la población estudiada no perteneció al mismo pool genético en donde fue desarrollado el iniciador.

- **Phy 14-Marcador GP94 (Sliwka *et al.*, 2010)**

Este iniciador sí se ajustó al tamaño del marcador reportado con 350 pb pero no discriminó entre las accesiones tolerantes y susceptibles. Phy 14 fue reportado evaluando 265 clones de seis cruza interespecíficas de *Solanum phureja* como un marcador discriminante (Zurita, Angulo, Veramendi, La Torre, & Gabriel, 2016). Sin embargo, Gabriel *et al.* (2016) muestran que este marcador solo fue efectivo para detectar el 20% del material tolerante. Nuestros resultados muestran esta tendencia de poca efectividad del marcador reportado que podría responder mejor en población de *Solanum phureja* según Zurita *et al.* (2016) y no en las especies de papas nativas peruanas ya que para este estudio el pool genético de las especies utilizadas mayormente provino de *S. goniocalyx*, *S. stenotomum*, *S. tuberosum ssp andigena*, *S. curtilobum*, *S. juzepczukii*, como potenciales parentales.

Por otro lado, Baldelomar *et al.* (2015) co-localizó el alelo para el marcador GP94 con el gen/QTL Rpi-phu1 resistente a *P. infestans* ubicado en el cromosoma IX a 350 pb (Sliwka *et al.* 2010). El alelo fue detectado en todas las variedades, con excepción del control susceptible derivado de *S. andígena*. Sin embargo, en los resultados de esta investigación sí se obtuvo una amplificación lo cual concuerda con Asano (2006), quien encontró amplificación de bandas del marcador HC aún cuando los genotipos expresaron susceptibilidad. Esto es explicado por Milczarek *et al.* (2011) quienes señalaron que algunos marcadores no son aplicables para la evaluación de accesiones resistentes debido al complejo origen genético de la papa.

- **Phy 15- Marcador 45/XI (Tomczynska *et al.*, 2014)**

Este marcador estuvo entre los **900 y 1500 bp** según Tomczynska *et al.* (2014). Fue utilizado con la variedad Sárpo Mira y aunque se obtuvieron falsos resultados, los autores seleccionaron a este marcador como la opción más confiable y más relacionada al gen en estudio.

En esta investigación tampoco llegaron a darse resultados contundentes con este marcador lo que podría deberse a que no hay relación con el gen específico en cuestión, sino también sus homólogos los cuales no confieren dicha resistencia según lo que reportaron Tomczynska *et al.* (2014). Además, se refuerza lo mencionado por Milczarek *et al.* (2011) y la ineficiencia de los marcadores moleculares pues ellos evaluaron algunos que no eran aplicables debido a orígenes genéticos complejos como se mencionó previamente.

- **Phy 16- Marcador CT88 (Colton *et al.*, 2006)**

Según Colton *et al.* (2006) citado por Tiwari *et al.* (2013), el marcador CT88 da un gran espectro de resistencia al tizón a los genes RB a través de la selección de marcadores asistidos (MAS).

De otro lado Van der Vossen *et al.* (2003), identificaron que el marcador CT88 está relacionado al Cromosoma VIII confiriendo resistencia mediante el gen Rpi-blb1 el cual fue anteriormente también vinculado a *S. bulbocastanum*. En este caso no se obtuvieron resultados significativos con el uso de este marcador debido a que una vez más las especies de papas nativas evaluadas en este trabajo difieren de *S. bulbocastanum*.

- **Phy 17- Marcador CT214 (Tan *et al.*, 2010)**

Los análisis obtenidos revelan que el marcador específico CT214 está altamente ligado con el locus de resistencia del gen Rpi-ber en el cromosoma X. Sin embargo, los mismos autores Adillah Tan *et al.* (2010) también reportaron falsos positivos en el marcador como parte de sus resultados sin dar conclusiones estables por el impacto controversial del marcador. Este marcador estuvo entre 100-200 pb y tampoco se ajustó a los resultados probablemente también debido a la población utilizada.

4.3. Prueba con la variedad “Capiro” (Susceptible)

Debido a que la anterior prueba tampoco pudo dar nociones de la discriminación de los primers en la investigación, se procedió a realizar una prueba sólo con la variedad “Capiro” recomendada como Susceptible y con un grupo de nuevos primers prediseñados desde el Instituto Neiker Tecnalia (España) (Anexo 4).

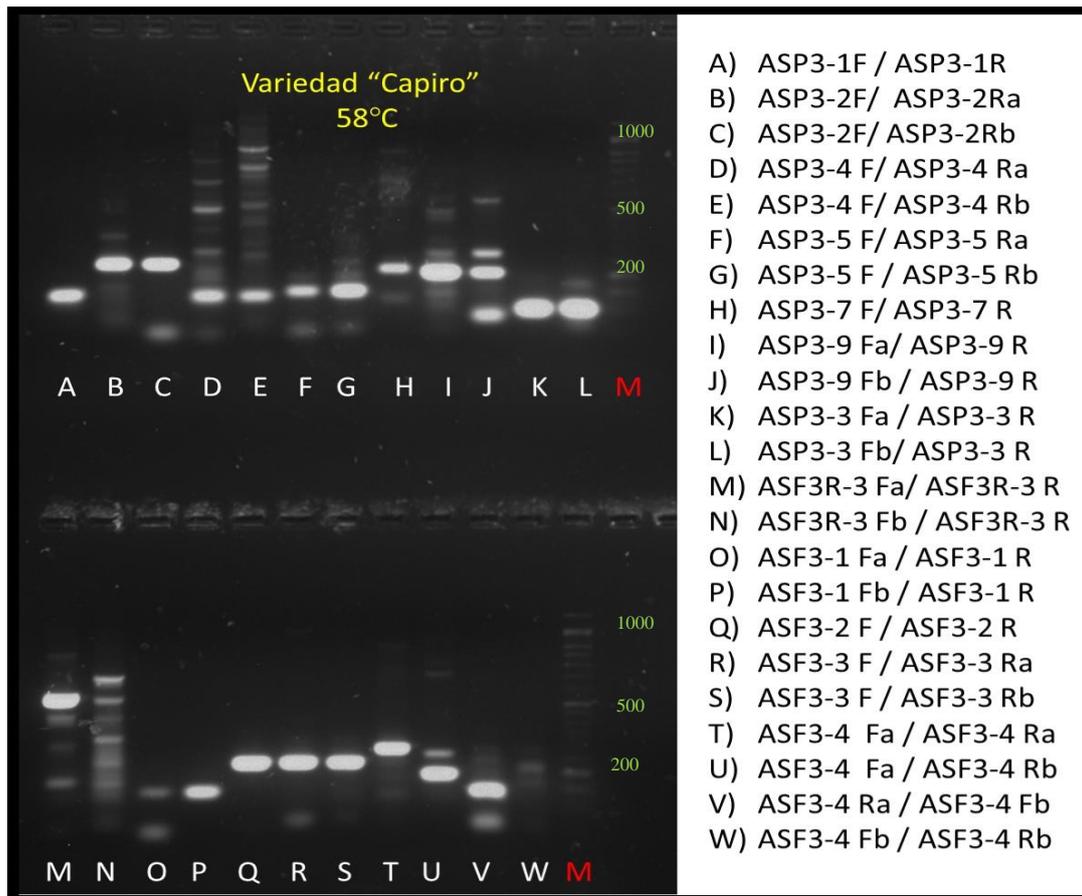


Figura 9: Variedad "Capiro" (Susceptible) puesta a prueba con el nuevo grupo de primers.

En este caso, a pesar de haber sido catalogada como una variedad susceptible, ha ocurrido la amplificación de todos los nuevos primers prediseñados. Estos resultados podrían deberse también a fallas técnicas durante momentos del proceso de extracción de ADN (Ver Anexo 5), aunque también se pueden encontrar discusiones desde la parte genética.

De acuerdo a Mullins *et. al* (2006) los marcadores ligados al rasgo de interés en poblaciones de mapeo pueden ser no efectivos en otras poblaciones debido a que la papa es una especie difícil de analizar en la mejora genética pues es poliploide, autoincompatible y altamente heterocigota. Adicionalmente se debe de tomar en cuenta que muchos rasgos de interés en papa son poligénicos y muy influenciados por el medio ambiente.

Debido a lo anterior, Bernaola (2008) concluye que se debe de realizar una verificación de la efectividad de los marcadores con una prueba en campo ya que la expresión de resistencia puede ser difícil de evaluar por factores ambientales, de desarrollo, estado fisiológico de la planta y la concentración de inóculo que podría haber. Aquí radica la importancia de evaluar resistencia bajo condiciones de campo o bajo condiciones controladas que reflejen un ambiente de cultivo como tal.

4.4. Prueba de los nuevos primers con las variedades tolerantes y susceptibles

En este caso se realizó el ensayo de PCR con los nuevos primers diseñados para resistencia a *P. infestans*. La temperatura de anillamiento utilizada fue la de 58°C como referencia general ya que sólo se deseaba ver la presencia o ausencia de las amplificaciones. En la Figura 7 y 8 se ven los dos geles de PCR con las 23 combinaciones de primers que se realizaron a una temperatura de 58° C.

La combinación de primers se realizó de manera ordenada con todas las combinaciones posibles entre todos los Reverse y Forward (Tabla 7). Cada primer tuvo información detallada del Laboratorio IDT (Integrated DNA Technologies).

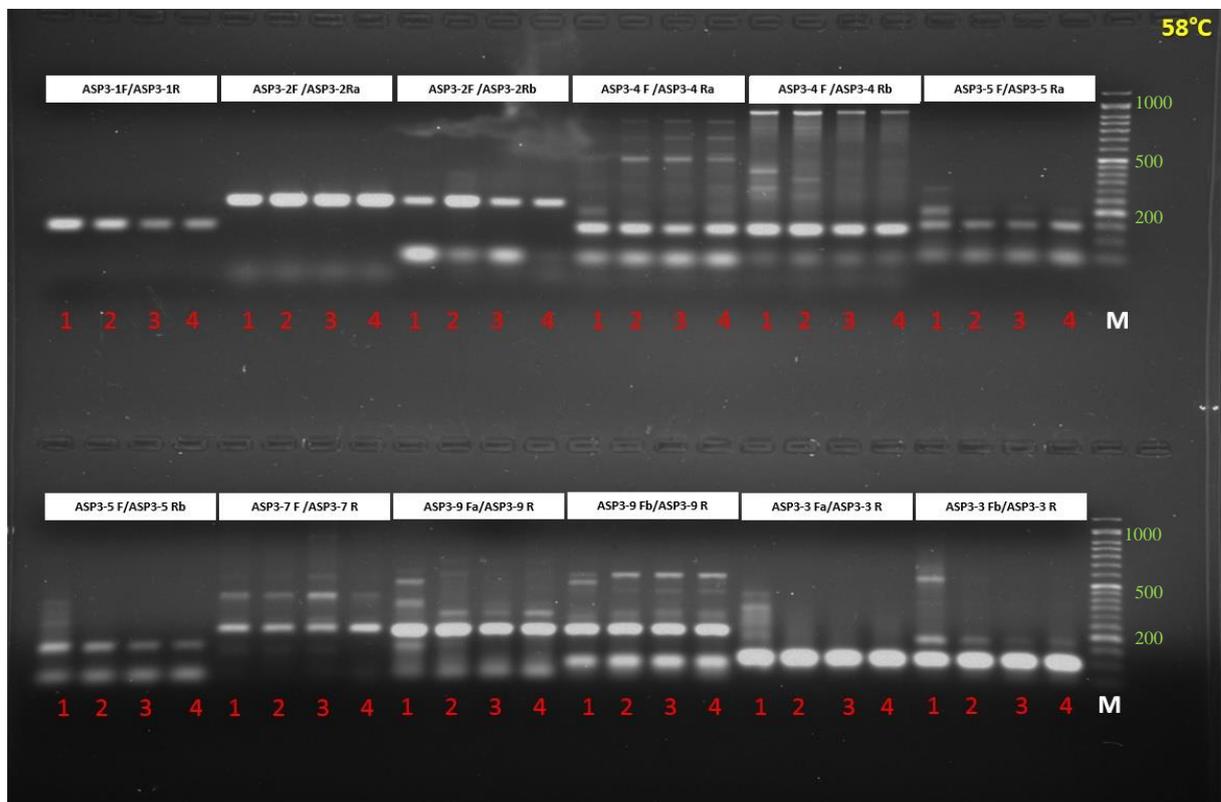


Figura 10: Primer grupo de resultados del gel con los individuos. 1 (302951.31-Tolerante); 2 (399077.59- Tolerante); 3 (397069.5-Susceptible) y 4 (Yana Huayro-Susceptible).

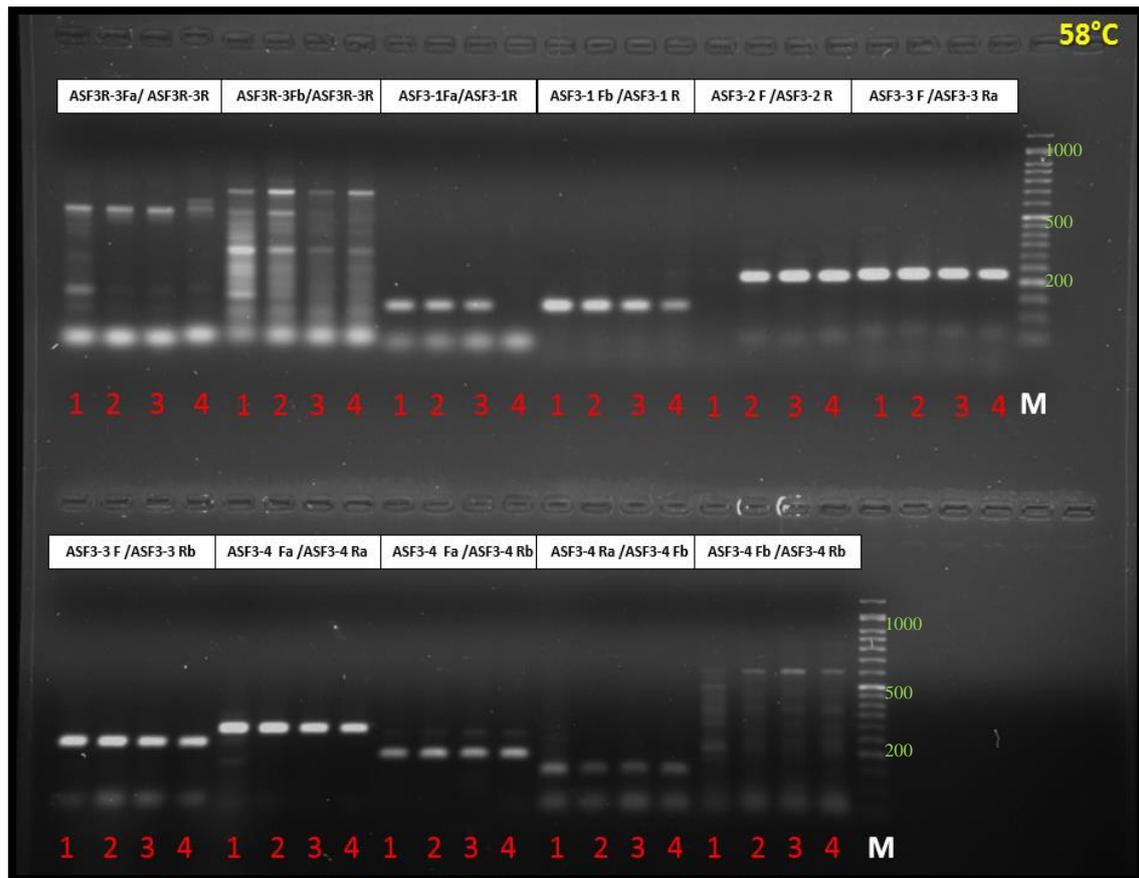


Figura 11: Segundo grupo de resultados del gel con los individuos. 1 (302951.31-Tolerante); 2 (399077.59- Tolerante); 3 (397069.5-Susceptible) y 4 (Yana Huayro-Susceptible).

Los resultados fueron los mismos después de las pruebas de electroforesis con los primers nuevos y no hubo discriminación significativa.

Gabriel *et al.* (2016) afirma que en los marcadores hay ciertas distancias entre los mismos y el gen de interés con lo que pueden darse recombinaciones. Es decir, se trata de marcadores polimórficos de donde se pueden seleccionar “falsos alelos” que amplifican de todas formas. Sin embargo, puede no haber correspondencia entre los marcadores y los fenotipos debido a que los genotipos que presentan bandas no tengan en sí el gen de resistencia y en realidad sean susceptibles o aquellos que no la presenten expresen el gen de resistencia.

De otro lado también se podría considerar la ineficiencia de los marcadores debido a la población utilizada, a lo que, según Niewöhner, Salamini, & Gebhardt (1995), existe una gran poza genética donde la predicción de un fenotipo basado en el genotipo de un marcador no es sencilla ya que hay muchas generaciones de recombinación meiótica que separaron a los individuos en dicha poza genética, puede haber un equilibrio entre gen específico de

resistencia y un marcador estrechamente ligado a dicho gen. Es decir, un alelo marcador conocido por co-heredarse con el gen de resistencia en una cruce dada podría no co-heredarse con dicho gen en una poza genética amplia.

V. CONCLUSIONES

1. Ninguno de los iniciadores previamente seleccionados fue efectivo en discriminar accesiones resistentes y susceptibles en el germoplasma de papas peruanas debido a que son marcadores desarrollados para genes de resistencia en *Solanum tuberosum* spp. *tuberosum* y *Solanum phureja*, de distintos genes de resistencia comparados a las papas nativas evaluadas en este trabajo.
2. Aún no se puede dar información certera sobre las 182 accesiones evaluadas y las respectivas resistencias a *Phytophthora infestans* debido a que no hubo discriminación alguna con los marcadores seleccionados.

VI. RECOMENDACIONES

1. Desarrollar marcadores moleculares propios para la población de papas nativas del Perú.
2. Repetir las pruebas, pero considerar menos población y tener un enfoque con pocos genes a detectar ya que una gran población puede no ser tan significativa que si se investigara en cambio, algo corto pero de mayor precisión.
3. Continuar las investigaciones sobre otros posibles resultados de los individuos como especies silvestres debido a sus posibles potenciales en medio de toda la diversidad de *Solanum tuberosum* ya existente.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADILLAH TAN, M. Y., HUTTEN, R., VISSER, R., & VAN ECK, H. 2010. The effect of pyramiding *Phytophthora infestans* resistance genes Rpi-mcd1 and Rpi-ber in potato. *Theor. Appl. Genet.*, 121(1):117–125.
- ADLER, N., ERSELIUS, L., CHACÓN, M., FLIER, W., ORDOÑEZ, M., KROON, L., & FORBES, G. A. 2004. Genetic diversity of *Phytophthora infestans* sensu lato in Ecuador provides new insight into the origin of this important plant pathogen. *Phytopathology*, 94: 154–162.
- ANTONOVICS, J., & ALEXANDER, H. 1989. *The concept of fitness in plant-fungal pathogen systems*. (K. Leonard & W. E. Fry, Eds.), *Plant Disease Epidemiology*. New York: McGraw- Hill.
- ASANO, K; KOBAYASHI, A; TDUSA, S; NISHINAKA, M; TAMIYA,S (2012). DNA marker-assisted evaluation of potato genotypes for potential resistance to potato cyst nematode pathotypes not yet invading into Japan. *Breeding Science*. 62 (2), 142-150.
- AUSUBEL, F. M.2001. Are innate immune signaling pathways in plants and animals conserved? *Nature Immunol.*, 6: 973–979.
- BALLVORA, A., ERCOLANO, M. R., WEIB, J., MEKSEM, K., BORMANN, C. A., OBERHAGERMANN, P., ... GEBHARDT, C. 2002. The R1 gene for potato resistance to late blight (*Phytophthora infestans*) belongs to the leucine zipper/NBS/LRR class of plant resistance genes. *The Plant Journal*, 30(3): 361–371.
- BALDELOMAR, MARIELA, GABRIEL, JULIO, VERAMENDI, SILENE, TERÁN, ARIANA, & PLATA, GIOVANNA. 2015. Correlación fenotípica y genotípica-molecular de la resistencia a enfermedades en variedades mejoradas de papa (*Solanum tuberosum* L.). *Journal of the Selva Andina Research Society*, 6(2), 36-50. Recuperado en 04 de diciembre de 2021, de http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2072-92942015000200002&lng=es&tlng=es.

- BERNAOLA, L. 2008. *Caracterización molecular de la resistencia al tizon tardío en Solanum paucisectum Ochoa (Solanaceae) mediante el uso de la técnica NBS y marcadores para loci candidatos*. Repositorio de Tesis UNMSM. Recuperado de Caracterización molecular de la resistencia al tizón tardío en Solanum paucisectum Ochoa (Solanaceae) mediante el uso de la técnica NBS y marcadores para loci candidatos (unmsm.edu.pe)
- BLAIR, J., COFFEY, M., PARK, S., GEISER, D., & KANG, S. 2008. A multi-locus phylogeny for *Phytophthora* utilizing markers derived from complete genome sequences. *Fungal Genetic Biology*, 45, 266–277.
- BLEIHOLDER, H., FELLER, C., HESS, M., MEIER, U., VAN DEN BOOM, T., LANCASHIRE, P., ... STAUSS, R. 2001. Growth stages of mono and dicotyledonous plants. Berlin and Braunschweig: Federal Biological Research Centre for Agriculture and Forestry.
- BODEGA, J. (2010). Cilaje de papa nativa para alimentación animal. Buenos Aires: Producción animal. pp. 32-38
- BONIERBALE, M., HAAN, S., & FORBES, G. A. 2010. Procedures for standard evaluation trials of advanced potato clones: An international cooperators' guide. International Potato Center (CIP).
- CHISHOLM, S. T., COAKER, G., DAY, B., & STASKAWICZ, B. J. 2006. Host-microbe interactions: Shaping the evolution of the plant immune response. *Cell*, 124, 803–814.
- COLON, L., & BUDDING, D. 1988. Resistance to late blight (*Phytophthora infestans*) in ten wild Solanum species. *Euphytica Supplement*. pp. 79-86.
- COOKE, L., & DEAHL, K. 1998. Potato blight-global changes and new problems. *Pesticide Outlook*, 9, 22–28.
- DANGL, J., & JONES, J. D. G. 2001. Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature*, 411, 826–833.
- DÍAZ M, M., FAJARDO, D. A., MORENO, J. D., & GARCÍA, C. 2003. Identificación de Genes R1 y R2 que confieren resistencia a *Phytophthora infestans* en genotipos colombianos de papa Identification of R1 and R2 Genes conferring resistance to *Phytophthora infestans* in Colombian potato genotypes, 40–50.
- EGÚSQUIZA, R. 2014. La Papa en el Perú. Lima: Universidad Nacional Agraria La Molina. 200 p.
- FORBES, G., PÉREZ, W., & CENTRO INTERNACIONAL DE LA PAPA (CIP). 2008. El tizón tardío de la papa. pp. 39.

- FRY, W. E. 2008. Plant diseases that changed the world. *Phytophthora infestans*: the plant (and R gene) destroyer. *Mol Plant Pathol.* 9. pp 385-402.
- FRY, W. E., & GOODWIN, S. B. 1997. Resurgence of the irish potato famine fungus. *Bioscience*, 47: 363–371.
- FRY, W. E., GOODWIN, S. B., DYER, A. T., MATUSZAK, J. M., DRANTH, A., TOOLEY, P. W., ... SANDLAN, K. P. 1993. Historical and recent migrations of *Phytophthora infestans*: chronology, pathways and implications. *Plant Diseases*, 77: 653–661.
- GABRIEL, J., VERAMENDI, S., PINTO, L., PARIENTE, L., & ANGULO, A. 2016. Asociaciones de marcadores moleculares con la resistencia a enfermedades, caracteres morfológicos y agronómicos en familias diploides de papa (*Solanum tuberosum* L.). *Revista Colombiana de Biotecnología*, XVIII(1), 17–32. [https://doi.org/DOI: 10.15446/rev.colomb.biote.v18n1.57712](https://doi.org/DOI:10.15446/rev.colomb.biote.v18n1.57712)
- GARRY, G., SALAS, A., FORBES, G., PÉREZ, W., CRUZ, M., & NELSON, R. 2005. Host socialization not detected in isolates of *Phytophthora infestans* attacking wild and cultivated potatoes in Peru. *European Journal of Plant Pathology*, 113, 71–81.
- GRANADOS-TOCHOY, J. C., & OROZCO-P, C. I. 2005. NOVEDADES COROLÓGICAS Y MORFOLÓGICAS EN *SOLANUM* SECCIÓN GEMINATA (SOLANACEAE) 1 Chorological and morphological novelties of *Solanum section Geminata* (Solanaceae). *Caldasia*, 27(1): 1–16.
- HERACLIDES, J., MAMANI, H., LINO, W., & HOLGUIN, V. 2020. MANUAL TÉCNICO: MANEJO INTEGRADO DEL CULTIVO DE PAPA.
- HAWKES, J. G. 1990. The potato evolution biodiversity and genetic resources. *Belhaven Press Washington, DC. EUA.* pp. 259.
- HUANG, S. 2005. *The discovery and characterization of the major late blight resistance complex in potato: genomic structure, functional diversity and implications.* Wageningen University, Wageningen. Recuperado de: <https://edepot.wur.nl/121627>
- INOSTROZA, J., MÉNDEZ, P., & SOTOMAYOR, L. (n.d.). I. Botánica y morfología de la papa. Carillanca: INIA Carillanca. pp. 1-7.
- JARAMILLO, S. 2003. Monografía sobre *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary. Medellín: Universidad Nacional de Colombia. pp. 141.
- JONES, J., & DANGL, J. 2006. The plant immune system. *Nature Publishing Group*, 444: 323–328.

- JUDELSON, H. S. 2014. *Genomics of Plant-Associated Fungi and Oomycetes: Dicot Pathogens*. (R. A. Dean, A. Lichens-Parl, & C. Kole, Eds.). Berlin Heidelberg: Springer Books. pp. 175.
- JUDELSON, H. S., & BLANCO, F. A. 2005. The spores of *Phytophthora*: weapons of the plant destroyer. *Nature Reviews Microbiology*. 3(1), 47–58. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1064>
- KARP, G. 2010. *Biología celular y molecular: Conceptos y experimentos*. (N. L. G. Carbajal, Ed.) (Sexta Edic). China. pp. 751-753.
- KHAVKIN, E.E. 2015. Potato late blight as a model of pathogen-host plant coevolution. *Russ.J.PlantPhysiol* 62: 408–419. <https://doi.org/10.1134/S1021443715030103>
- LATIJNHOUWERS, M., & GOVERS, F. 2003. A *Phytophthora infestans* G-protein & b-subunit is involved in sporangium formation. pp. 971-977.
- MILCZAREK, D.; FLIS. B.; PRZETAKIEWICZ, A. 2011. Suitability of molecular markers for selection of potatoes resistant to *Globodera spp*. *Am. J. Potatoe Res*, 88, 245-255.
- MINAGRI. (2017). Boletín: Papa, características de la producción nacional y de la comercialización de lima metropolitana. Dirección general de políticas agrarias.
- MINAGRI. 2019. Ficha Técnica del cultivo de Papa. Retrieved from <https://www.minagri.gob.pe/portal/especialivcenagro/25sectoragrario/papa/207-papa>
- MOSQUERA, T., FERNÁNDEZ, C., MARTÍNEZ, L., ACUÑA, A., & CUELLAR, D. 2008. Genetics of the *Solanum tuberosum* pathogen resistance. State of research. *Agronomía Colombiana*, 26(1), 7–15. Retrieved from http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S012099652008000100002
- MULLINS, E., MILBOURNE, D., PETTI, C., DOYLE-PRESTWICH, B., & MEADE, C. 2006. Potato in the age of biotechnology. *Trends in Plant Science*, 11 : 254–260.
- NADEZHDA, Z., MEZAKA, I., VILCANE, D., ULRIKA, C.-N., ILZE, S., & NILS, R. 2014. Assessment of genes R1 and R3 conferring resistance to late blight and of gene R YSTO conferring resistance to potato virus Y in two wild species accessions and their hybrid progenies. *Proceedings of the Latvian Academy of Sciences*, 68: 133–141.
- NIEWÖHNER, J., SALAMINI, F., & GEBHARDT, C. 1995. Development of PCR assays diagnostic for RFLP markers closely linked to alleles Gro1 and H1 conferring resistance to the root cyst nematode *Globodera rostochiensis* in potato. *Mol. Breed.*, 1: 65–78.

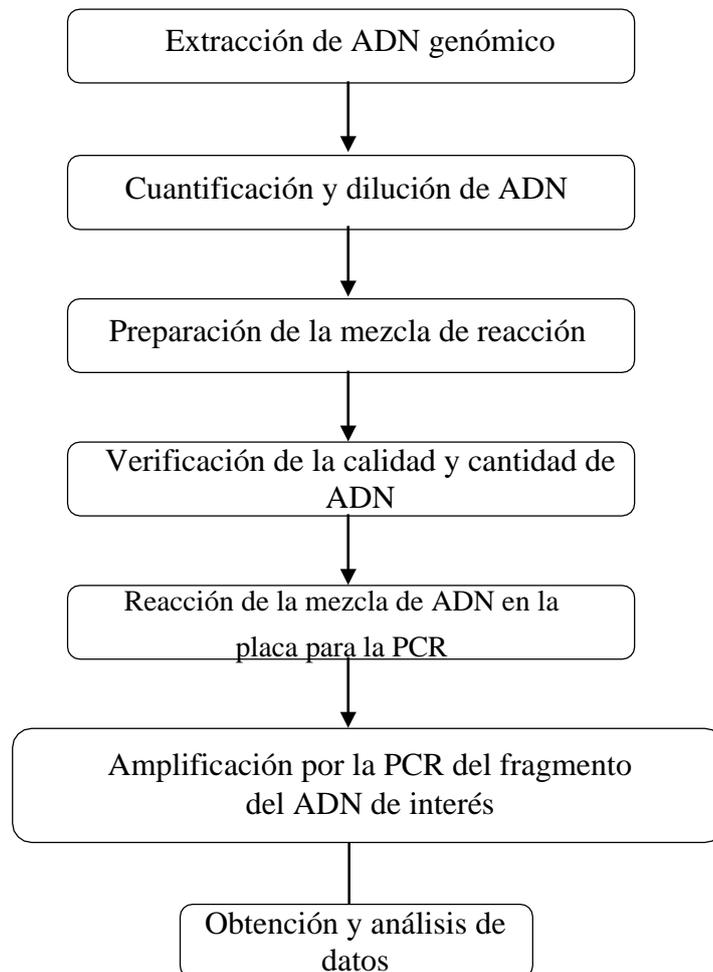
- GE HEALTHCARE BIOSCIENCE. 2009. Nucleic acid sample preparation for downstream analyses. Principles and methods. Retrieved from: contents (vwr.com).
- ORENGO, D. 2013. *Fundamentos de Biología Molecular* (Primera ed). Barcelona: UOC. pp. 244.
- OYARZUN, P., POZO, A., ORDOÑEZ, M., DOUCETT, K., & FORBES, G. (1998). Host specificity of *Phytophthora infestans* on tomato and potato in Ecuador. *Phytopathology*, 88: 265–271.
- RAMAKRISHNAN, A., RITLAND, C., BLAS, R., & RISEMAN, A. 2015. Selection, Review of Potato Molecular Markers to Enhance Trait. *American Journal of Potato Research*. 92: 455–472. <https://doi.org/10.1007/s12230-015-9455-7>
- RAUSCHER, G. M., SMART, C. D., SIMKO, I., BONIERBALE, M., MAYTON, H., GREENLAND, A., & FRY, W. E. 2006. Characterization and mapping of RPi-ber, a novel potato late blight resistance gene from *Solanum berthaultii*. *Theor. Appl. Genet*, 112, 674–687.
- RITTER, E., RUIZ DE GALARRETA, J. I., BARANDALLA, L., LOPEZ, R., ATILIO, M., CAZZIO, S., ... BONIERBALE, M. 2009. Native Potatoes – A crop with potential for high added value for sustainable agriculture. *Revista Latinoamericana de La Papa*, 15(January), 58- 60.
- ROSS, H. 1986. Potato breeding. Problems and perspectives. *Adv. Plant. Breed. Suppl*, 13, 82–86.
- ROSS, H. 1986. Potato breeding-problems and perspectives. Berlin and Hamburg: Advances in Plant Breeding. pp.132.
- SÄRKINEN, T., BADEN, M., GONZÁLES, P., CUEVA, M., GIACOMIN, L. L., SPOONER, D. M., ... KNAPP, S. (2015). Listado anotado de *Solanum* L. (Solanaceae) en el Perú. *Revista Peruana de Biología*, 22(1), 003–062. <https://doi.org/10.15381/rpb.v22i1.11121>
- SIMON, R., FUENTES, A. F., & SPOONER, D. M. 2011. Biogeographic implications of the striking discovery of a 4000 kilometer disjunct population of the wild potato *Solanum morelliforme* in South America. *Systematic Botany*, 36, 1062–1067.
- SLIWKA, J., JAKUEZUN, H., KAMINSKI, P., & ZIMONCH-GUZOWSKA, E. 2010. Marker-assisted selection of diploid and tetraploid potatoes carrying Rpi-phu1, a major gene for resistance to *Phytophthora infestans*. *J. Appl. Genet.*, 51(2), 133.

- SMART, C. D., SANDROCK, R. W., & FRY, W. E. 2000. Molecular Techniques and Mystery of the Potato Late Blight Pathogen. *Plant-Microbe Interactions*. American Phytopathology Society. pp. 336.
- SONG, J., BRAADEN, J. M., NAESS, S. K., RAASCH, J. A., WIELGUS, S. M., HABERLACH, G. T., ... JIANG, J. 2003. Gene RB cloned from *Solanum bulbocastanum* confers broad resistance to potato late blight. *Proc. Natl. Acad. Sci. United States of America*, 100: 9128–9133.
- SONG, K., LIU, P., & OSBORN, T. C. 1995. Rapid genome change in synthetic polyploids of Brassica and its implications for polyploid evolution. *Proceed. Natl. Acad. Sci. USA*, 92, 7719–7723.
- SPOONER, D.M., & HIJMANS, R. 2001. Potato systematics and germplasm collecting, 1989-2000. *Am J Potato Res.* pp. 237-268.
- SPOONER, D.M., VAN DEN BERG, R. G., RODRÍGUEZ, A., BAMBERG, J. B., HIJMANS, R. J., & LARA-CABRERA, S. 2004. Wild potatoes (*Solanum* section Petota; Solanaceae) of North and Central America. *Systematic Botany Monographs*, 68, 1–209.
- SPOONER, DAVID M., VAN DEN BERG, R. G., BRYAN, G. J., & DEL RIO, A. 2003. Species Concepts and Relationships in Wild and Cultivated Potatoes. *Species Concepts and Relationships in Wild and Cultivated Potatoes*. Proc. XXVI IHC – Potatoes - Healthy Food for Humanity. pp.13.
- SUASSUNA, N., MAFFIA, L., & MIZUBUTI, E. 2004. Aggressiveness and host specificity of Brazilian isolates of *Phytophthora infestans*. *Plant Pathology*, 53, 405–413.
- TAZELAAR, M. 1981. The screening of *Solanum* species for horizontal resistance against late blight (*Phytophthora infestans*) and its use for breeding programmes. *8th Triennial Conference of the European Association for Potato Research*. MÜNCHEN, Germany. pp. 34-36.
- TIWARI, J., SIDDAPPA, S., PAL SINGH, B., SURINDER, K., SWARUP, K., BHARDWAJ, V., & CHANDEL, P. 2013. Molecular markers for late blight resistance breeding of potato: an update. *Plant Breeding*, 132, 237–245.
- TOMCZYNSKA, I., STEFANCZYK, E., CHMIELARZ, M., KARASIEWICZ, B., KAMINSKI, P., JONES, J., ... SLIWKA, J. 2014. A locus conferring effective late blight resistance in potato cultivar Sárpo Mira maps to chromosome XI. *Theor. Appl. Genet*, 127, 647–657.

- VAN DER VOSSEN, E., SIKKEMA, A., LINTEL HEKKERT, B. TE, GROS, J., STEVENS, P., MUSKENS, M., ... ALLEFS, S. 2003. An ancient R gene from the wild potato species *Solanum bulbocastanum* confers broad-spectrum resistance to *Phytophthora infestans* in cultivated potato and tomato. *The Plant Journal*, 36, 867–882.
- ZURITA, I., ANGULO, A., VERAMENDI, J., LA TORRE, J., & GABRIEL, J. 2016. Resistencia genética en familias de híbridos de papa (*Solanum tuberosum* L.) a tizón y estrés hídrico por sequía. *Revista Latinoamericana de La Papa*, 2(20), 1–13. Retrieved from <http://www.papaslatinas.org/ojs/index.php/index/oai>

VIII. ANEXOS

Anexo 1: Flujograma del Protocolo General de extracción de ADN.



Anexo 2: Fotografías adicionales del proceso de extracción de ADN.

Imagen 1: Transiluminador UV para verificar geles de agarosa.



Imagen 2: NanoDrop One^c para determinar calidad de ADN.

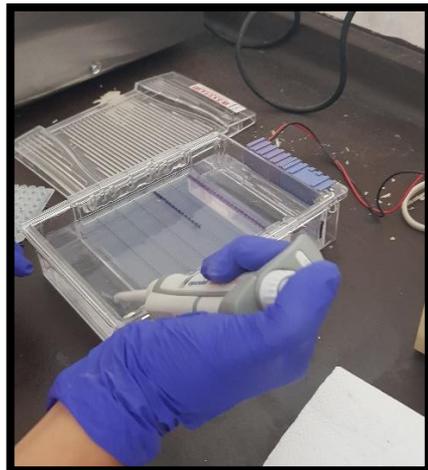
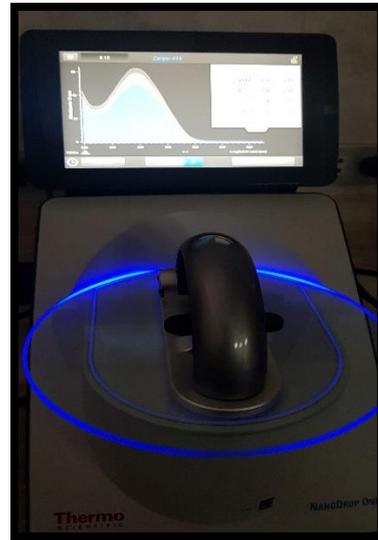


Imagen 3:
Carga en el gel de agarosa para Electroforesis



Imagen 4:
Programación del ciclo de PCR en el Termociclador

Anexo 3: Datos detallados de los individuos utilizados en este trabajo.

Código	Dato pasaporte	Cantidad de ADN (µg/ηl)	A260/280	A260/230	Vol. De disolución en el total (ηl)	Volumen doble (ηl)
I-01	399058.12	544.9	1.98	2.04	3.7	7.3
I-02	302951.31	2159.1	2.14	2.21	0.9	1.9
I-3	COL 122	1092.9	2.02	2.24	1.8	3.7
I-4	COL 082	1832.7	1.98	1.98	1.1	2.2
I-5	399079.4	2885.7	2.03	2.18	0.7	1.4
I-6	399077.59	2388.4	2.01	2.11	0.8	1.7
I-7	302231.12	1644.4	1.95	2.11	1.2	2.4
I-8	COL 094	1252.6	1.98	1.79	1.6	3.2
I-9	395112.19	1888.4	1.99	1.98	1.1	2.1
I-10	RC2099.48	2066.6	1.9	1.96	1.0	1.9
I-11	399073.39	1697.9	1.99	2.05	1.2	2.4
I-12	396034.18	1091.6	1.99	2.03	1.8	3.7
I-13	RC 14543-B	1293.6	2	2.19	1.5	3.1
I-14	397069.5	1631.4	1.99	2.13	1.2	2.5
I-15	Huayro rojo	1528.1	2	2.13	1.3	2.6
I-16	Muru huayro	1987.2	1.99	1.97	1.0	2.0
I-17	Palta murunqui	2096.9	1.97	2.06	1.0	1.9
I-18	Mauna	2527	2.02	2.12	0.8	1.6
I-19	Pumapa maquin negro	2148.9	2.01	2.23	0.9	1.9
I-20	Cuchillo paqui	1494.3	1.99	2.09	1.3	2.7
I-21	Pulursh	1190.8	1.99	2	1.7	3.4
I-22	Peruanita	1062.7	2.01	1.99	1.9	3.8
I-23	Pamaspa Huarian	1130.3	1.98	2.2	1.8	3.5
I-24	Camotillo	770.1	1.9	1.72	2.6	5.2
I-25	Yana Huancuy	2997.6	1.97	2.12	0.7	1.3
I-26	Yana piña	1590.2	1.98	2.15	1.3	2.5
I-27	Talmish	2449.7	1.99	2.1	0.8	1.6
I-28	Chaulina	2077.8	1.99	2.1	1.0	1.9
I-29	Perdiza runtun	1504.4	1.97	2.14	1.3	2.7
I-30	Ñata doce	1981.6	1.95	1.84	1.0	2.0
I-31	Sumacc soncco	640	1.9	1.79	3.1	6.3
I-32	Yana lengua de vaca	1292.8	1.99	2.23	1.5	3.1
I-33	Huayta chuco	1107.1	2	2.15	1.8	3.6
I-34	Calito	1512.1	1.96	2.06	1.3	2.6
I-35	Yuracc shiri	802.4	1.98	2.1	2.5	5.0
I-36	Yana huayro	2170.5	1.96	2.1	0.9	1.8
I-37	Ishcupuro	1179.4	1.92	2.05	1.7	3.4
I-39	17 Yana shiri waña	795.6	1.94	2	2.5	5.0
I-40	19 Callina shiri	2712.3	1.97	2.12	0.7	1.5
I-41	21 Suytu poqya	1940.9	1.96	2.1	1.0	2.1
I-42	22 Yana Gaspar	2460.2	1.99	2.26	0.8	1.6
I-43	24 Dosis	3155.7	1.96	2.07	0.6	1.3
I-44	41 Dosis	1647.2	1.94	2.08	1.2	2.4

I-45	40 Suytu gaspar	701.7	1.92	1.89	2.9	5.7
I-46	16 China shiri	821.9	1.89	1.75	2.4	4.9
I-47	6 Ccanchillo	3616.3	1.95	2.07	0.6	1.1
I-48	11 Camotillo	1552.1	1.96	2.19	1.3	2.6
I-49	2 Puka camotillo	2595.9	1.96	2.13	0.8	1.5
I-50	10 Huaña	1637.8	1.94	1.95	1.2	2.4
I-51	9 Camotillo amarillo	2247.2	1.97	2.19	0.9	1.8
I-52	15 Mashua papa	2592.4	1.99	2.17	0.8	1.5
I-53	1 Camotillo	3768.5	1.87	1.86	0.5	1.1
I-55	5 Yana winqu	1567.6	1.96	2.2	1.3	2.6
I-56	23 Puka camotillo	921.9	1.89	1.8	2.2	4.3
I-57	13 Yuraq manua	1093	1.91	1.87	1.8	3.7
I-58	2-9 Pumapa maquin	1114.8	1.94	1.75	1.8	3.6
I-59	20 Yuraq poqya	1073.6	1.93	1.99	1.9	3.7
I-60	27 Wallas	965.8	1.91	1.93	2.1	4.1
I-61	29 Puka puqya	2393.3	1.97	2.18	0.8	1.7
I-62	38 Yana manua	1178.7	1.94	1.67	1.7	3.4
I-63	42 Poqya	2063.7	1.95	2.17	1.0	1.9
I-64	8 Camotillo rojo	4905.3	1.98	2.16	0.4	0.8
I-65	25 Galindo gaspar	1521.1	1.95	2.1	1.3	2.6
I-66	12 Suytu camotillo	2080.4	1.95	2.11	1.0	1.9
I-67	37 Duraznillo	2622.3	1.98	2.04	0.8	1.5
I-68	Huancavelica I rojo	972.9	1.89	1.68	2.1	4.1
I-69	Huancavelica II blanco	2091.9	1.95	2.09	1.0	1.9
I-70	Locka	668.8	1.93	1.85	3.0	6.0
I-71	Piñaza	1152.6	1.93	2.1	1.7	3.5
I-72	2041	819.3	1.94	2.05	2.4	4.9
I-73	1665	1732.3	1.94	2.04	1.2	2.3
I-74	35	866.3	2.05	2.28	2.3	4.6
I-75	728	641.7	1.92	1.82	3.1	6.2
I-76	2235	2932.1	1.95	2.02	0.7	1.4
I-78	2459	9052.3	1.91	1.99	0.2	0.4
I-79	1109	1483.4	1.93	2.06	1.3	2.7
I-80	1689	958.4	1.92	1.9	2.1	4.2
I-81	2877	1170.2	1.92	1.83	1.7	3.4
I-82	611	2693.1	1.98	2.07	0.7	1.5
I-83	729	1088.3	1.94	2.07	1.8	3.7
I-84	2870	1432.7	1.95	2.25	1.4	2.8
I-86	732	1086.9	1.93	1.9	1.8	3.7
I-88	1024	1344.8	1.94	1.88	1.5	3.0
I-89	941	1497.1	1.95	1.98	1.3	2.7
I-90	2003	1704	1.93	1.96	1.2	2.3
I-92	144	998.3	1.95	2.19	2.0	4.0
I-93	1501	985.2	1.93	2.1	2.0	4.1
I-94	1351	1782.8	1.92	1.97	1.1	2.2
I-95	3000	2219.8	1.98	2.18	0.9	1.8

I-96	2611	1789.9	1.96	2.12	1.1	2.2
I-97	2018	1345.3	1.96	2.01	1.5	3.0
I-98	2350	999.9	1.94	1.89	2.0	4.0
I-99	2343	1640.3	1.97	2.05	1.2	2.4
I-100	3898	976.5	1.94	1.94	2.0	4.1
I-102	1358	516.1	1.93	1.97	3.9	7.8
I-103	2776	2048.2	1.93	1.94	1.0	2.0
I-104	1436	2534.7	1.99	1.88	0.8	1.6
I-106	1100	1063.8	1.93	1.99	1.9	3.8
I-107	2537	965.8	1.95	2.05	2.1	4.1
I-108	1517	711.9	1.92	2.03	2.8	5.6
I-109	3003	2069.9	1.99	2.19	1.0	1.9
I-110	2739	1450	1.94	2	1.4	2.8
I-111	2826	981.6	1.95	1.94	2.0	4.1
I-112	3057	2219.3	1.97	2.18	3.1	6.2
I-113	395	646.8	1.88	1.68	0.9	1.8
I-114	Laco	2167.1	1.97	2.18	0.7	1.4
I-115	Muru wayruru	2762.5	1.99	2.16	1.2	2.5
I-116	Muru Olomes	1605.2	1.96	2.02	0.8	1.7
1	Alq'a Tarma	2422.1	1.99	2.22	0.8	1.7
2	Santa Rita	2078.7	1.98	2.08	1.0	1.9
3	Luntusa	3492.9	1.97	2.07	0.6	1.1
4	Waka Laqra	1024.1	1.95	2.17	2.0	3.9
5	Alq'a Pitiquiña	2179.1	1.98	2.04	0.9	1.8
6	Morado	1232	1.94	1.99	1.6	3.2
7	Wayro	1474.6	1.95	1.99	1.4	2.7
8	Piña Negra	1075	1.93	1.98	1.9	3.7
9	Imilla Negra	854.4	1.97	2.04	2.3	4.7
10	Alq'a Imilla	3069.7	2.03	2.13	0.7	1.3
11	Gendarme	780.7	2	2.16	2.6	5.1
12	Q'oyllo	3238.2	1.99	2.24	0.6	1.2
13	Puka Mari	1186.4	1.93	2.07	1.7	3.4
14	nn	2413.1	1.96	2.17	0.8	1.7
15	Q'oyllo	3209.7	1.95	2.24	0.6	1.2
16	Imilla Blanca	233.7	1.87	1.38	8.6	17.1
17	Casa Blanca	2944.4	1.95	2.15	0.7	1.4
18	Tantalla Turqueza	2726.5	2.02	2.18	0.7	1.5
19	Tantalla	3993	1.97	2.11	0.5	1.0
20	Tantalla Blanca	1374.4	1.97	2.06	1.5	2.9
21	Khuchi Q'allu	1048.7	1.98	2.1	1.9	3.8
22	Lomo Jaspeado	347.6	1.93	1.8	5.8	11.5
23	Ch'ikiña Blanca	1531.1	1.98	1.98	1.3	2.6
24	Q'ullo Q'auna	1199.6	1.97	1.98	1.7	3.3
25	Alq'a Wacra Laqra	1426.1	1.96	2.03	1.4	2.8
26	Santiaguito	754.7	1.95	1.84	2.7	5.3
27	Pepino	2211.1	2	2.11	0.9	1.8
28	Sika Sika	5495.1	2	2.28	0.4	0.7
29	Piña Blanca	1540.1	1.94	2.07	1.3	2.6
30	Lomo Azul	2169.9	1.99	2.16	0.9	1.8
31	Yungay	1064.9	1.95	1.85	1.9	3.8
32	Parqo Morado	856.9	1.93	1.87	2.3	4.7

33	Yurac Kauchalli	3407	1.99	2.12	0.6	1.2
34	Tajta	2212.9	1.98	2.01	0.9	1.8
35	Huila Saq'ampaya	2066.4	2	2.09	1.0	1.9
36	Sutamari	2763	2.01	2.17	0.7	1.4
37	Jacu Acupallata	540.2	1.94	1.68	3.7	7.4
38	Tajta Rosada	2117.2	1.74	1.1	0.9	1.9
39	Kak'a Pata	597.5	1.98	1.85	3.3	6.7
40	Pitiquilla Roja	1868.3	1.99	2.05	1.1	2.1
41	nn	1683.5	2.01	2.19	1.2	2.4
42	Canasta	2087.2	1.99	2.1	1.0	1.9
43	Juan Domingo	1435.6	1.98	2.03	1.4	2.8
44	Negro Pampina	696.7	1.92	1.91	2.9	5.7
45	Cresta de Gallo	1022.1	1.91	1.93	2.0	3.9
46	Q'ello Suita	1076.3	1.98	1.91	1.9	3.7
47	nn	2009.2	1.97	2.13	1.0	2.0
48	nn	1212.9	2	2.08	1.6	3.3
49	nn	1569.8	1.99	1.98	1.3	2.5
50	Muruq'o	1279.5	2	2.01	1.6	3.1
51	Morado Ch'ikilla	3516.5	2	2.15	0.6	1.1
52	Waka Ñuño	2248.4	2.02	2.21	0.9	1.8
53	nn	2536.9	2.01	2.01	0.8	1.6
54	nn	970	1.95	2.03	2.1	4.1
55	Moroq'o Luk'i	1482.3	2.15	2.7	1.3	2.7
56	Ch'iara Imilla	2819.8	2.03	2.07	0.7	1.4
58	W	3071	1.96	2.02	0.7	1.3
59	Piñaza	1407.6	2	1.99	1.4	2.8
60	Loka	1087.3	1.95	2.07	1.8	3.7
III-15	1689	2011.7	1.97	2.2	1.0	2.0
III-92	333	1974.1	1	2	1.0	2.0
IV-1	5	1721.1	1.94	1.96	1.2	2.3
IV-3	4	2156.3	1.96	1.99	0.9	1.9
IV-4	25	1608.6	1.96	2.17	1.2	2.5
IV-5	7	749.8	1.95	1.78	2.7	5.3
IV-6	2	1795	1.96	2.12	1.1	2.2
IV-7	3	1804.5	1.96	2.12	1.1	2.2
IV-9	13	2881	2.14	2.18	0.7	1.4
IV-11	26	1390.7	1.95	1.94	1.4	2.9
IV-12	23	1254.8	1.96	2.06	1.6	3.2
IV-13	10	3280.9	1.9	1.31	0.6	1.2
IV-14	Cajamarca 1	835.1	1.87	1.46	2.4	4.8
IV-15	22	932.7	1.98	2.1	2.1	4.3
IV-16	16	1323.7	1.92	1.88	1.5	3.0
IV-17	Cajamarca?	2014.6	2.02	2.55	1.0	2.0
IV-18	19	1957.6	1.96	2.01	1.0	2.0
IV-19	15	1593.9	1.87	1.74	1.3	2.5
IV-22	27	2578.7	1.95	2.07	0.8	1.6
IV-23	14	1935.5	1.93	1.92	1.0	2.1
IV-24	Cajamarca 2	2071.9	1.99	2.14	1.0	1.9

Anexo 4: Problemas técnicos/manuales que podrían interferir en los resultados de amplificación en PCR.

PROBLEMA	POSIBLE CAUSA	SOLUCIÓN
BANDAS EXTRA O NO ESPECÍFICAS DEL GEL	Los primers hibridizaron un sitio secundario en el proceso	Nuevo diseño de primers que son menos específicos para sitios secundarios. Incrementar la temperatura de anillamiento entre 2°C ó 5°C
	Contaminación de ADN fue introducida en los primers o buffers	Correr un control negativo (sin muestra de ADN). Preparar muestras frescas si es que hay contaminación
	Mucha muestra de ADN fue adicionada.	Medir la cantidad de muestra para el sistema
	Concentración muy alta de primers	Medir la cantidad de primers para el sistema y reparar o calibrar el ciclo térmico. Probar con una máquina nueva
	Ciclo térmico no fue determinado a la temperatura correcta	
EXCESIVO MANCHADO DE LA AMPLIFICACIÓN DE ADN DESPUÉS DEL ANÁLISIS DEL GEL	Muchos ciclos fueron programados	Reducir el número de ciclos debajo de 35
	Las condiciones de ciclos térmicos no fueron óptimas para el termociclador en uso	Optimizar las condiciones basadas en las recomendaciones del fabricante
	La temperatura de anillamiento fue muy baja	Reoptimizar la temperatura de anillamiento. Incrementar la temperatura de 2°C a 5°C
	Tiempo de extensión fue muy largo	Reducir el tiempo de extensión en pequeños incrementos
	Baja calidad de ADN	ADN no puro puede fallar en la amplificación apropiada. Usar DNA fresco o muestras obtenidas por otros métodos
DÍMEROS DE PRIMER VISIBLES DESPUÉS DEL ANÁLISIS DE GEL	Mucha cantidad de primer fue adicionada/ alta concentración de primer	Medir la cantidad de primers para el ensayo
	Los primers poseen secuencias complementarias de superposición	Diseñar primers para evitar autocomentos en secuencias internas. Incrementar la temperatura de anillamiento

Fuente: "Nucleic acid sample preparation for downstream analyses. Principles and methods" (2009)