



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE
HUANCAMELICA**

(Creada por Ley N° 25265)

ESCUELA DE POSGRADO

FACULTAD DE CIENCIAS DE INGENIERÍA

UNIDAD DE POSGRADO



TESIS

**ANÁLISIS DE LA DIVERSIDAD DE PAPAS (*Solanum spp.*) CON
MARCADORES MOLECULARES MICROSATÉLITE DE LOS
DISTRITOS DE SECCLLA Y SANTO TOMÁS DE PATA
(HUANCAMELICA) Y SANTILLANA (AYACUCHO)**

LÍNEA DE INVESTIGACIÓN: BIODIVERSIDAD

PRESENTADO POR:

Mg. Saturnino Martín, TENORIO BAUTISTA

**PARA OPTAR EL GRADO DE DOCTOR EN:
CIENCIAS AGROPECUARIAS**

HUANCAMELICA – PERÚ

2018



UNIVERSIDAD NACIONAL DE HUANCAMELICA
(Creado por la ley N°25265)
ESCUELA DE POSGRADO
UNIDAD DE POSGRADO
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS



"Decenio se la Igualdad de Oportunidades para Mujeres y Hombres"
"Año del Dialogo y las Reconciliación Nacional"

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

Ante el jurado conformado por los docentes: **Dr. David, RUIZ VILCHEZ; Dr. Gregorio José, ARONE GASPAS;**
Dr. Solón Dante, CARHUALLANQUI IBARRA.

Asesor: Dr. Ruggierths Neil, DE LA CRUZ MARCOS

De conformidad al reglamento para optar el grado Académico de Maestro y doctor de la escuela de posgrado,
aprobado mediante Resolución Directoral 148-2016-EPG-R/UNH.

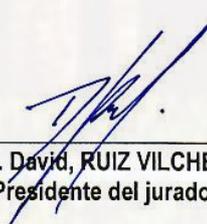
El candidato al **GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS AGROPECUARIAS**

Don, **Mg. TENORIO BAUTISTA, Saturnino Martin**, procedió a sustentar su trabajo de investigación titulado
**"ANALISIS DE LA DIVERSIDAD DE PAPAS (*Solanum spp.*) CON MARCADORES MOLECULARES
MICROSATELITE DE LOS DISTRITOS DE SECCLLA Y SANTO TOMAS DE PATA (HUANCAMELICA) Y
SANTILLANA (AYACUCHO)".**

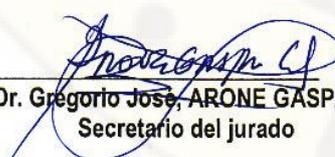
Luego, de haber absuelto las preguntas que le fueron formuladas por los miembros del jurado, se dio por concluido
al ACTO de sustentación, realizándose la deliberación y calificación, resultando:

Con el calificativo: Aprobado Por..... **UNANIMIDAD**
Desaprobado

Y para constancia se extiende la presente ACTA, en la ciudad Acobamba, a los veintiséis días del mes de
setiembre del año 2018.



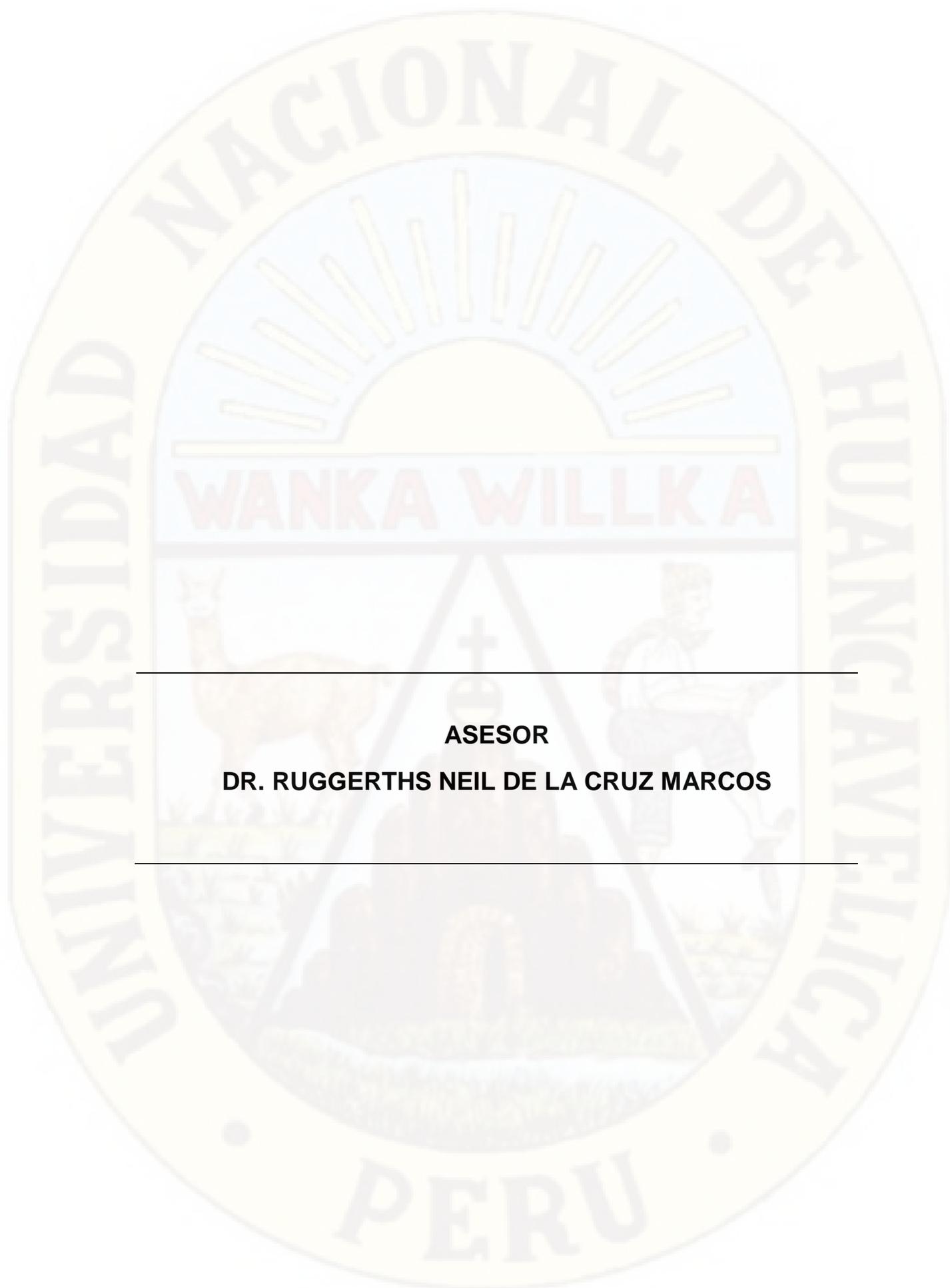
Dr. David, RUIZ VILCHEZ
Presidente del jurado



Dr. Gregorio José, ARONE GASPAS
Secretario del jurado



Dr. Solón Dante, CARHUALLANQUI IBARRA
vocal del jurado



ASESOR

DR. RUGGERTHS NEIL DE LA CRUZ MARCOS

JURADOS

Dr. David RUIZ VILCHEZ

Presidente del jurado

Dr. Gregorio José ARONE GASPAS

Secretario del jurado

Dr. Solón Dante CARHUALLANQUI IBARRA

Vocal del jurado



A mi esposa e hijos

AGRADECIMIENTO

A la Universidad Nacional de Huancavelica, Facultad de Ciencias de Ingeniería y la Unidad de Posgrado, que agradezco por haberme conducido al estudio del doctorado en Ciencias Agropecuarias.

Al Centro de Investigación de Biología Molecular y Bioinformática, de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, donde se ejecutó el presente trabajo de tesis.

A los docentes que participaron en la enseñanza orientando y brindando parte de su conocimiento.

A mi asesor: Dr. Ruggerths Neil De La Cruz Marcos, Profesor Principal de la Universidad Nacional de Huancavelica, por el apoyo constante durante el planteamiento del proyecto y ejecución del trabajo de investigación, transmitiendo sus valiosos conocimientos.

Al Blgo. Tomás Yuret Miranda Tomasevich, por su apoyo en la ejecución del presente trabajo de tesis.

Al Dr. Raúl Blas Sevillano, por su apoyo, colaboración, orientación, comprensión y aliento en la ejecución del trabajo de tesis.

Al Mg. Joel Flores Ticona, por su apoyo, colaboración, orientación, comprensión y aliento en la ejecución de la investigación.

A la Mg. Inés Torre Arias, por su apoyo, colaboración, orientación, comprensión y aliento en la ejecución de la investigación.

Al MS. Reynán Cóndor Alarcón, por su apoyo en la parte estadística del presente trabajo de investigación.

Al Maestro Anatolio Huarcaya, por su colaboración en la colección de accesiones de papa de los distritos de Seclla y Santo Tomás de Pata provincia de Angaraes región Huancavelica.

A los agricultores de los distritos de Santillana provincia de Huanta región Ayacucho, Seclla y Santo Tomás de Pata de la provincia de Angaraes región Huacavelica, por conservar en sus campos de cultivos la biodiversidad de papas (*Solanum spp*).

A mis compañeros de estudio y colegas de trabajo, con los que compartimos experiencias inolvidables y agradezco a las personas que me brindaron su gran apoyo durante el proceso del presente trabajo, a quienes les aprecio con mucho cariño.

RESUMEN

El presente trabajo de investigación se realizó con los objetivos de estudiar los perfiles moleculares de la diversidad genética, comparar la variabilidad y distancias genéticas de los marcadores moleculares de *papas (Solanum spp.)*, de los distritos de Secclla, Santo Tomás de Pata y Santillana. Se muestrearon 128 especímenes de tubérculos que fueron cultivados el 18 de julio de 2017 en bolsas polietileno con dos repeticiones cada uno, el muestreo de los folíolos jóvenes se ejecutaron el 03 de setiembre de 2017 que fueron trasladados al laboratorio de Investigación en Biología Molecular de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, donde se realizaron la extracción del ADN utilizando el método de CTAB, determinando la calidad, concentración y cuantificación del ADN utilizando un espectrofotómetro de NANODROP (ND-1000), realizando PCR por 30 ciclos de amplificación y electroforesis en geles de poliacrilamida, después del revelado se realizaron las lecturas de los alelos de SSR codificando los resultados en matriz binaria donde “1” indicó presencia y “0” ausencia. Los datos se analizaron con los paquetes estadísticos de coeficiente Simple Matching, NTSYS 2.10p, método de agrupamiento UPGMA para estimar el polimorfismo, la prueba de hipótesis se realizó utilizando el análisis de varianza molecular (AMOVA). Hallándose el PIC promedio de 0.238, siendo el cebador más informativo STG-0001 con valor 0.287 que señala la existencia del polimorfismo, el porcentaje del loci (%P) polimórfico varían de 97.30% a 89.19% con un promedio de 92.79%, demostrando que presentan número mayor de loci variables. Se encontró que la distancia e identidad genética, las poblaciones que exhiben mayor relación genética comprenden a Santillana y Santo Tomás de Pata, siendo la identidad genética de Nei 0.986, denotando que las accesiones de estas poblaciones presentan mayores características en común y las accesiones de Secclla son más diferentes genéticamente. El análisis molecular de varianza (AMOVA) con dos componentes, 91.55% de la variación procede de la variabilidad dentro de poblaciones, mientras la variabilidad entre poblaciones es 8.45% indicando que la variabilidad entre poblaciones no es alta, presentan mayores características en común.

Palabras Clave: Diversidad genética de *Solanum spp.*, Microsatélite Ayacucho - Huancavelica.

ABSTRACT

The present research work was carried out with the objectives of studying the molecular profiles of genetic diversity, compare the variability and genetic distances of the molecular markers of potatoes (*Solanum spp.*), the districts of Secclla, Santo Tomás de Pata and Santillana. We sampled 128 specimens of tubers that were cultivated on July 18, 2017 in polyethylene bags with two repetitions each, the sampling of the young folioles were executed on September 3, 2017 that were transferred to the Research Laboratory in Molecular Biology of the National University of San Cristóbal de Huamanga, where DNA extraction was performed using the CTAB method, determining the quality, concentration and quantification of DNA using a NANODROP spectrophotometer (ND-1000), performing PCR for 30 cycles of amplification and electrophoresis in polyacrylamide gels, after the development, the readings of the SSR alleles were made, coding the results in binary matrix where "1" indicated presence and "0" absence. The data were analyzed with statistical packages of Simple Matching coefficient, NTSYS 2.10p, UPGMA clustering method to estimate the polymorphism, the hypothesis test was performed using molecular variance analysis (AMOVA). Finding the average PIC of 0.238, being the most informative primer STG-0001 with value 0.287 that indicates the existence of the polymorphism, the percentage of the polymorphic loci (% P) vary from 97.30% to 89.19% with an average of 92.79%, showing that present a higher number of variable loci. It was found that the distance and genetic identity, the populations that exhibit the highest genetic relationship include Santillana and Santo Tomás de Pata, being the genetic identity of Nei 0.986, denoting that the accessions of these populations have greater characteristics in common and the accessions of Secclla They are more genetically different. The molecular analysis of variance (AMOVA) with two components, 91.55% of the variation comes from the variability within populations, while the variability between populations is 8.45% indicating that the variability between populations is not high, they present greater characteristics in common.

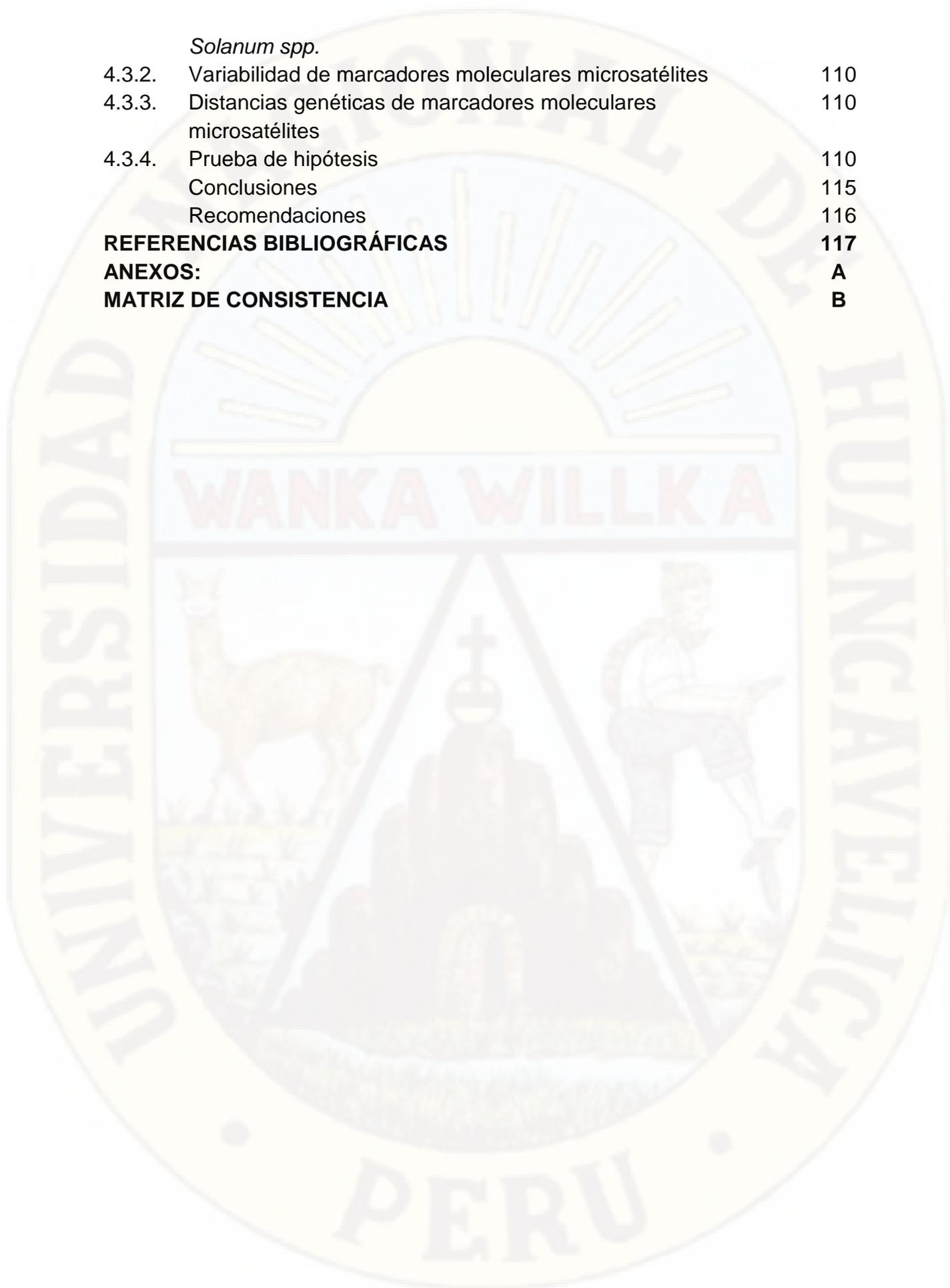
Key words: Genetic diversity of *Solanum spp.*, Microsatellite Ayacucho - Huancavelica

ÍNDICE DEL CONTENIDO

	Página.
Carátula	i
Acta de sustentación	ii
Asesor	iii
Jurados	iv
Dedicatoria	v
Agradecimiento	vi
Resumen	vii
Abstract	viii
Índice del contenido	ix
Índice de tablas	xii
Índice de figuras	xiv
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I: EL PROBLEMA	3
1.1. Planteamiento del problema	3
1.2. Formulación del problema	4
1.2.1. General	4
1.2.2. Específicos	5
1.3. Objetivos de la investigación	5
1.3.1. Objetivo general	5
1.3.2. Objetivos específicos	5
1.4. Justificación	5
CAPITULO II: MARCO TEÓRICO	7
2.1. Antecedentes de la investigación	7
2.2. Bases teóricas	16
2.2.1. Aspectos evolutivos de las ´papas cultivadas	16
2.2.2. El cultivo de la papa y su importancia	19
2.2.3. Factores que influyen en la diversidad y estructura genética	21
2.2.4. Mejoramiento genético de <i>Solanum tuberosum</i> “papa”	22
2.2.5. Posición taxonómica de la papa	26
2.2.6. El DNA o ADN	26
2.2.7. Protocolo de extracción de ADN	29
2.2.8. Marcadores genéticos y marcadores moleculares	32
2.2.9. Los marcadores microsatélites o SSR	35
2.2.10. Usos de microsatélites en papa	38
2.2.11. Aislamiento de ADN	38
2.2.12. Etiquetado de ADN	39
2.2.13. Cuantificación de los ácidos nucleicos	41
2.2.14. Determinación de calidad de ADN	41
2.2.15. Endonucleasas de restricción	42
2.2.16. Reacción de cadena de la polimerasa (PCR)	42
2.2.17. Electroforesis	44
2.3. Marco conceptual	45

2.4.	Marco filosófico	47
2.5.	Formulación de hipótesis	51
2.6.	Identificación de variables	51
2.7.	Definición operativa de variables e indicadores	52
2.7.1.	Matriz de operacionalización de variables	52
CAPÍTULO III: METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN		53
3.1.	Tipo de la investigación	53
3.2.	Nivel de investigación	56
3.3.	Métodos de investigación	56
3.3.1.	Colección de muestras de tubérculos de papas (<i>Solanum spp.</i>)	56
3.3.2.	Siembra	65
3.3.3.	Brotación y crecimiento	66
3.3.4.	Colección de muestra	66
3.3.5.	Extracción de ADN o caracterización molecular	67
3.3.6.	Determinación de la calidad y concentración del ADN	69
3.3.7.	Cuantificación del ADN	70
3.3.8.	Selección de los primers microsatélites	70
3.3.9.	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	72
3.3.10.	Electroforesis en geles de poliacrilamina	72
3.3.11.	Fijación, tinción y revelado de gel	72
3.3.12.	Lectura de alelos de SSR	74
3.4.	Diseño de investigación	75
3.5.	Población, muestra y muestreo	76
3.6.	Técnicas e instrumentos de recolección de datos	76
3.7.	Técnicas de procesamiento y análisis de datos	77
3.7.1.	Procesamiento y análisis de los resultados	77
3.8.	Puntos de corte en dendrogramas	79
3.9.	Descripción de la prueba de hipótesis	79
CAPITULO IV: PRESENTACIÓN DE RESULTADOS		81
4.1.	Presentación e interpretación de datos	81
4.1.1.	Perfiles moleculares de la diversidad genética de papa <i>Solanum spp.</i>	81
4.1.2.	Variabilidad de marcadores moleculares microsatélites	83
4.1.3.	Distancias genéticas de marcadores moleculares microsatélites	84
4.2.	Discusión de resultados	96
4.2.1.	Perfiles moleculares de la diversidad genética de papa <i>Solanum spp.</i>	96
4.2.2.	Variabilidad de marcadores moleculares microsatélites	99
4.2.3.	Distancias genéticas de marcadores moleculares microsatélites	102
4.3.	Proceso de pruebas de hipótesis	109
4.3.1.	Perfiles moleculares de la diversidad genética de papa	109

<i>Solanum spp.</i>	
4.3.2. Variabilidad de marcadores moleculares microsatélites	110
4.3.3. Distancias genéticas de marcadores moleculares microsatélites	110
4.3.4. Prueba de hipótesis	110
Conclusiones	115
Recomendaciones	116
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	117
ANEXOS:	A
MATRIZ DE CONSISTENCIA	B



ÍNDICE DE TABLAS

		Página.
1	Tabla 1. Clasificación citológica y taxonómica de la papa	16
2	Tabla 2. Relación de accesiones de papas (<i>Solanum spp.</i>) colectados en el distrito de Santillana para análisis microsatélites	57
3	Tabla 3. Puntos de muestreo con coordenadas UTM y altitud según Google Earth de Santillana	57
4	Tabla 4. Relación de accesiones de papas (<i>Solanum spp.</i>) colectados en el distrito de Santo Tomás de Pata para análisis microsatélites	58
5	Tabla 5. Puntos de muestreo con coordenadas UTM y altitud según Google Earth de Santo Tomás de Pata	58
6	Tabla 6. Relación de accesiones de papas (<i>Solanum spp.</i>) colectados en el distrito de Seclla para análisis microsatélites	59
7	Tabla 7. Puntos de muestreo con coordenadas UTM y altitud según Google Earth de Seclla	59
8	Tabla 8. Marcadores microsatélites utilizados en la evaluación de papas (<i>Solanum spp.</i>) proveniente de distrito de Santillana, Seclla y Santo Tomás de Pata	72
9	Tabla 9. Reactivos para la amplificación por PCR de SSR	73
10	Tabla 10: Protocolo de fijación, tinción y revelado de geles de poliacrilamida	75
11	Tabla 11. Ejemplo de matriz binaria de datos con la presencia/ausencia de los alelos de STG-0001 con diez bandas de las 10 primeras accesiones de <i>Solanum spp.</i> “papa” procedente del distrito de Santillana	76
12	Tabla 12. Valores de diferenciación genética entre las poblaciones (F_{ST}) para análisis de AMOVA	82
13	Tabla 13. Valores del índice de contenido polimórfico (PIC) e índice de combinación de 8 pares de iniciadores microsatélites utilizados en el análisis de diversidad de <i>Solanum spp.</i> “papa” procedentes de Seclla, Santo Tomás de Pata y Santillana.	83
14	Tabla 14. Valores de los iniciadores de Secuencia Simple Repetida para 8 pares de iniciadores del índice de combinación de iniciadores y del promedio del PIC por poblaciones	84
15	Tabla 15. Porcentaje de <i>loci</i> polimórfico (%P) del análisis molecular con marcadores microsatélites de <i>Solanum spp.</i> “papa” procedentes de Seclla, Santo Tomás de Pata y Santillana.	85
16	Tabla 16. Promedio y desviación estándar del Índice de información de Shannon’s (I) y Heterocigosidad esperada (He) del análisis molecular con marcadores microsatélites de <i>Solanum spp.</i> “papa” procedentes de Seclla, Santo Tomás de	86

	Pata y Santillana.	
17	Tabla 17. Distancia e identidad genética de Nei del análisis de marcadores microsatélites de <i>Solanum spp.</i> “papa” procedentes de Santillana, Seclla y Santo Tomás de Pata	87
18	Tabla 18. Análisis molecular de variancia (AMOVA) con dos componentes, del análisis de marcadores microsatélites de <i>Solanum spp.</i> “papa” procedentes de Santillana, Santo Tomás de Pata y Seclla.	110
19	Tabla 19. Análisis molecular según F_{ST} , del análisis de marcadores microsatélites de <i>Solanum spp.</i> “papa” procedentes de Santillana, Santo Tomás de Pata y Seclla.	111
20	Tabla 20. Frecuencia de bandas, Frecuencia de alelos estimados (p & q), tamaño de la muestra (N), número de alelos (N_a), número de alelos efectivos (N_e), heterocigocidad esperada (H_e) e índice de información de Shannon'n (I), por grupos y población.	D

ÍNDICE DE FIGURAS

		Página.
1	Figura 1. Relaciones evolutivas de las papas cultivadas con sus ancestros silvestres y sus niveles de ploidia (Adaptado de Hawkes, 1990).	17
2	Figura 2. Principales factores que influyen en los niveles de diversidad genética dentro de una población. N_E es el número de la población efectiva (Adaptado de Freeland, 2005).	22
3	Figura 3. Segmento aplanado de la doble hélice de ADN	27
4	Figura 4: Modelo de extracción de ADN método CTAB	31
5	Figura 5. Microsatélites, ejemplo de un di-nucleótido A-C(n)	36
6	Figura 6. Motivos repetitivos y polimorfismo de los Microsatélites o SSR.	37
7	Figura 7. Proceso de etiquetado de ADN	40
8	Figura 8. Cuadro sinóptico de marco conceptual de <i>Solanum tuberosum</i> spp. “papa” de tres distritos de los departamentos de Ayacucho y Huancavelica.	46
9	Figura 9: Ubicación del distrito de Santillana provincia de Huanta región Ayacucho y gerreferenciación de los puntos de muestreo según Google Earth	54
10	Figura 10: Ubicación del distrito de Santo Tomás de Pata provincia de Angaraes región Huancavelica y gerreferenciación de los puntos de muestreo según Google Earth	55
11	Figura 11: Ubicación del distrito de Seclla provincia de Angaraes región Huancavelica y gerreferenciación de los puntos de muestreo según Google Earth	56
12	Figura 12. Fotografías de los tubérculos de 128 muestras de <i>Solanum</i> spp. “papa” colectados en los distritos de Santillana, Santo Tomás de Pata y Seclla, para análisis microsatélites	65
13	Figura 13. Tubérculos de <i>Solanum</i> spp. “papa” para el análisis microsatélites sembrados el 18 de julio de 2017 procedentes de Santillana, Seclla y Santo Tomás de Pata.	66
14	Figura 14. Brotación y crecimiento de las accesiones de <i>Solanum</i> spp. “papa” para el análisis de microsatélites procedentes de Santillana, Seclla y Santo Tomás de Pata.	67
15	Figura 15. Muestreo de hojas tiernas de <i>Solanum</i> spp. “papa” para el análisis de microsatélites de <i>Solanum</i> spp. “papa” procedentes de Santillana, Seclla y Santo Tomás de Pata.	68
16	Figura 16. Extracción del ADN de hojas tiernas de <i>Solanum</i> spp. “papa” para el análisis de microsatélites de muestras procedentes de Santillana, Seclla y Santo Tomás de Pata.	69
17	Figura 17. Lectura de la calidad y concentración de ADN <i>Solanum</i> spp “papa” para el análisis de microsatélites procedentes de Santillana, Santo Tomás de Pata y Seclla	70

18	Figura 18. Bandas de ADN obtenido después del revelado	75
19	Figura 19: Dendrograma de relación genética entre accesiones de papa de tres poblaciones	87
20	Figura 20. Dendrograma de 128 accesiones <i>Solanum spp.</i> "papa" procedentes de Santillana provincia de Huanta región Ayacucho, Santo Tomás de Pata y Secclla de la provincia de Angaraes región Huancavelica.	89
21	Figura 21. Coordenadas principales con coeficiente Jaccard, NTSYS 2.10p de 128 accesiones de papas (<i>Solanum spp.</i>) procedentes de, Secclla y Santo Tomás de Pata de la provincia de Angaraes región Huancavelica y Santillana provincia de Huanta región Ayacucho	90
22	Figura 22. Dendrograma de 49 accesiones <i>Solanum spp.</i> "papa" procedentes del distrito de Santillana provincia de Huanta región Ayacucho.	94
23	Figura 23. Dendrograma de 40 accesiones <i>Solanum spp.</i> "papa" provenientes del distrito de Santo Tomás de Pata provincia de Angaraes región Huancavelica.	96
24	Figura 24. Dendrograma de 39 accesiones <i>Solanum spp.</i> "papa" provenientes del distrito de Secclla provincia de Angaraes región Huancavelica.	99
25	Figura 25. Campos de cultivo de <i>Solanum spp.</i> "papa" del distrito de Santillana provincia de Huanta región Ayacucho	J
26	Figura 26. Campos de cultivo de <i>Solanum spp.</i> "papa" del distrito de Santo Tomás de Pata provincia de Angaraes región Huancavelica	K
27	Figura 27. Campos de cultivo de <i>Solanum spp.</i> "papa" del distrito de Secclla provincia de Angaraes región Huancavelica	L
28	Figura 28. Las 128 accesiones de <i>Solanum spp.</i> "papa" procedentes de los distritos de Santillana, Santo Tomás de Pata y Secclla	M
29	Figura 29. Las 128 accesiones de <i>Solanum spp.</i> "papa" en plena brotación procedentes de los distritos de Santillana, Santo Tomás de Pata y Secclla	M
30	Figura 30. Evolución de algunas de las 128 accesiones de <i>Solanum spp.</i> "papa" a los 39 días después de la siembra de accesiones procedentes de los distritos de Santillana, Santo Tomás de Pata y Secclla	O
31	Figura 31. Diferencias en su brotación y crecimiento de las 128 accesiones de <i>Solanum spp.</i> "papa" procedentes de los distritos de Santillana, Santo Tomás de Pata y Secclla	P
32	Figura 32. Plantas de algunas accesiones de <i>Solanum spp.</i> "papa" mostrando el haz y envés de las hojas antes del muestreo para la extracción de ADN procedentes de los	Q

- distritos de Santillana, Santo Tomás de Pata y Seclla
- 33 Figura 33. Muestreo de las hojas más jóvenes de las 128 accesiones de *Solanum spp.* “papa”, para la extracción de ADN procedentes de los distritos de Santillana, Santo Tomás de Pata y Seclla R
- 34 Figura 34. Extracción, determinación de la calidad y concentración de ADN de las 128 accesiones de *Solanum spp.* “papa”, procedentes de los distritos de Santillana, Santo Tomás de Pata y Seclla S
- 35 Figura 35. Proceso de corrido de ADN en gel de poliacrilamida, fijación, tinción y revelado de los alelos de SSR de las 128 accesiones de *Solanum spp.* “papa”, procedentes de los distritos de Santillana, Santo Tomás de Pata y Seclla T
- 36 Figura 36. Lectura de los alelos de SSR de las 128 accesiones de *Solanum spp.* “papa”, procedentes de los distritos de Santillana, Santo Tomás de Pata y Seclla U

INTRODUCCIÓN

La utilización eficiente de los recursos fitogenéticos depende de su adecuada caracterización. Tradicionalmente, estas caracterizaciones se han realizado utilizando largas listas de descriptores fenotípicos, principalmente de tipo morfológico o agronómico. Esto ha permitido diferenciar algunos materiales, pero a veces en forma imprecisa, debido a la interacción de estas variables con las condiciones ambientales⁵⁵. Los marcadores moleculares presentan muchas ventajas en comparación con los marcadores genéticos de tipo morfológico, especialmente por su alto número y su independencia de los efectos del medio ambiente. Los marcadores permiten revelar las diferencias que existen entre los genomas como producto del proceso evolutivo. Como aplicaciones de estas técnicas se puede mencionar la definición de grupos genéticos a nivel intra-específico (entre la misma especie) y la organización filogenética de las especies, o sea, las relaciones evolutivas entre distintas especies⁵⁶.

El Perú junto con Bolivia son los principales países donde la papa se ha domesticado y empezó su cultivo, desde hace miles de años han participado los pobladores que les encontraron una utilidad como alimento, con la selección que realizaban cada campaña tomaron características deseables mejoraron las características de dicho cultivo, convirtiéndose en su alimento, su cultivo empezó en las diferentes condiciones medio ambientales de la serranía los mismos fueron adquiriendo resistencia al ataque a plagas, enfermedades y heladas que se presenta en los Andes que aún mantienen un flujo de genes con estas características de resistencia y tolerancia, que se puede aprovechar en el mejoramiento genético. En la región andina de éstos países existe una amplia diversidad de cultivares con diversidad de formas y colores de los tubérculos, los variados colores de la pulpa y más importante aún, su contenido de antocianinas que se utilizan como antioxidantes que previenen muchas enfermedades, entre ellas el cáncer. Los agricultores andinos continuarán conservando la gran diversidad de papas nativas si tienen una oportunidad de mercado para sus cosechas.

En Huancavelica en “Catálogo de variedades de papa nativa de Huancavelica – Perú”, describen un total de 144 variedades que representan solamente una cuarta parte del total de variedades de esta región una impresionante diversidad de variedades nativas, estudios preliminares indican que cuenta con 500 a 600 variedades⁵¹.

La mayor diversidad de papas en muchos lugares no está inventariada, desconociéndose esta diversidad, que muy bien podría ser aprovechada si se conociera sus bondades genéticas, agronómicas, alimenticias y sus formas de utilización. Muchas de las variedades nativas de *Solanum spp.*, han sido identificadas por las características morfológicas y citogenéticas entre otros procedimientos. En la actualidad para corroborar estos estudios, se puede identificar a través de los marcadores microsatélites que representan una de las

tecnologías más importantes para el análisis de los genomas, nos permiten asociar variaciones genómicas y características heredables de interés agronómico y de calidad, que resultan importantes dentro de un programa de mejoramiento. Dentro de los marcadores moleculares empleados, los microsatélites ofrecen varias ventajas, entre ellas su comportamiento codominante, multiallelismo, el alto nivel de polimorfismo, simplicidad de trabajo, el bajo requerimiento de la cantidad y la calidad de ADN, gran distribución en el genoma y su reproducibilidad^{1,2}.

La diversidad entre organismos es consecuencia de las diferencias en las secuencias de los nucleótidos del ADN y de los efectos ambientales. El análisis de secuencias simples repetidas (SSR) ha resultado útil para la comprensión de los fenómenos biológicos, abriendo nuevas perspectivas para la interpretación, modelado y la información sobre la diversidad genética para optimizar las estrategias de conservación de los recursos genéticos³.

La identificación molecular basada en pruebas de ADN-fingerprint utilizando marcadores de microsatélites (SSRs) ha sido descrita como una poderosa herramienta de identificación de clones y cultivares de papa que podría facilitar enormemente la conservación y manejo del germoplasma de papa. El Centro Internacional de la Papa (CIP), ha utilizado este tipo de marcadores para evaluar el nivel de error en sus sistemas de etiquetado dentro de grandes colecciones de germoplasma que superan las 5.000 accesiones. La incorporación de este tipo de herramientas en el mejoramiento de papa facilitará el manejo de colecciones, tanto *in vitro* como en campo, y será de gran apoyo a las actividades de intercambio de germoplasma con los distintos centros y programas, dedicados a esta actividad. La caracterización molecular de la biodiversidad de *Solanum* spp., constituye la base para iniciar trabajos de mejoramiento genético que permitan dar respuesta a la creciente exigencia de nuevas variedades, con resistencia a plagas y enfermedades, altos niveles de producción y calidad culinaria. En virtud a lo descrito en los párrafos anteriores se considera que el uso de los marcadores microsatélites (SSR) para estudios de diversidad genética en papa, es de suma importancia en programas de mejoramiento genético, en tanto se propone realizar del presente proyecto de investigación^{4,5,6}.

CAPÍTULO I EL PROBLEMA

1.1. Planteamiento del problema

Desde tiempos muy remotos los pobladores andinos han mantenido una diversidad de papas, reconociendo sus bondades culinarias, de transformación, medicinal o simplemente para sus rituales. En la actualidad, las papas han creado muchas expectativas en los consumidores por sus bondades alimenticias, ricos en materia seca, vitamina C y carotenos. La presencia de antioxidantes es mayor cuanto más morada, azul o negra es la papa. Por este carácter, las papas, especialmente aquellos con pulpa pigmentada de colores oscuros tienen mucha demanda en el mercado.

El Perú es uno de los mayores centros mundiales de diversidad de recursos genéticos con 182 especies domesticadas de plantas nativas y 5 de animales, ocupando el quinto lugar entre los países megadiversos del planeta; siendo reconocido por ello como uno de los centros de origen de la agricultura y de la ganadería. Pruebas arqueológicas señalan que las papas, otros tubérculos y raíces fueron primero domesticados en los Andes de Sudamérica hace ocho a diez mil años y luego de una ardua tarea de selección y domesticación, los agricultores nativos mantienen y conservan hoy en día una gran variedad de cultivares diferentes de papa, principalmente con fines de autoconsumo^{7, 52}.

La identificación molecular basada en pruebas de ADN-fingerprint utilizando marcadores de microsatélites (SSRs) que constituye una herramienta altamente eficaz para la identificación de clones y cultivares de papa que va facilitar enormemente la conservación y manejo del germoplasma. Este tipo de análisis ha resultado útil para la comprensión

de los fenómenos biológicos, abriendo nuevas perspectivas para la interpretación, modelado y la información sobre la diversidad genética para optimizar las estrategias de conservación de los recursos genéticos y por sus cualidades en estudios en *Solanum spp.*, “papa” tales como investigaciones filogenéticas, estudios taxonómicos, además presenta un elevado polimorfismo, herencia mendeliana simple son codominantes, fáciles de medir y analizar, con confiabilidad del 100% repetitivos y automatizables^{4, 5, 61, 83, 86,} .

La mayor diversidad de papas en muchos lugares no está inventariada, desconociéndose esta diversidad, que muy bien podría ser aprovechada si se conociera sus bondades genéticas, agronómicas, alimenticias y sus formas de utilización. Muchas de las variedades nativas de *Solanum spp.*, han sido identificadas por las características morfológicas y citogenéticas entre otros procedimientos. En la actualidad para corroborar estos estudios, se debe identificar a través de los marcadores microsatélites que representan una de las tecnologías más importantes para el análisis de los genomas, nos permiten asociar variaciones genómicas y características heredables de interés agronómico y de calidad, que resultan importantes dentro de un programa de mejoramiento. Dentro de los marcadores moleculares empleados, los microsatélites ofrecen varias ventajas, entre ellas su comportamiento codominante, multiallelismo, el alto nivel de polimorfismo, simplicidad de trabajo, el bajo requerimiento de la cantidad y la calidad de ADN, gran distribución en el genoma y su reproducibilidad^{2, 3}.

La caracterización molecular de la biodiversidad de *Solanum spp.*, constituye la base para iniciar trabajos de mejoramiento genético que permitan dar respuesta a la creciente exigencia de nuevas variedades, con resistencia a plagas y enfermedades, altos niveles de producción y calidad culinaria. En virtud a lo descrito en los párrafos anteriores se considera que el uso de los marcadores microsatélites (SSR) para estudios de diversidad genética en papa, es de suma importancia en programas de mejoramiento genético, en tanto se propone realizar del presente proyecto de investigación.

1.2. Formulación del problema

1.2.1. General

- ¿Cuáles serán las características de papas (*Solanum spp.*) utilizando marcadores moleculares microsatélite de la diversidad genética, de los distritos de Secclla y Santo Tomás de Pata de la provincia de Angaraes - Huancavelica y distrito de Santillana de la provincia Huanta - Ayacucho?

1.2.1.1. Específicos

- ¿Cuáles serán los perfiles moleculares de la diversidad genética de papas (*Solanum spp.*), procedentes de los distritos de Secclla, Santo Tomás de Pata y Santillana?
- ¿Cuál será la variabilidad en los marcadores moleculares microstaélites de la diversidad genética de papas (*Solanum spp.*), procedentes de los distritos de Secclla, Santo Tomás de Pata y Santillana?
- ¿Cuáles serán las distancias genéticas entre los marcadores moleculares microstaélites de la diversidad genética de papas (*Solanum spp.*), procedentes de los distritos de Secclla, Santo Tomás de Pata y Santillana?

1.3. Objetivos de la investigación

1.3.1. Objetivo General.

- Estudiar las características de papas (*Solanum spp.*) mediante marcadores moleculares microsatélite de la diversidad genética de los distritos de Secclla y Santo Tomás de Pata de la provincia de Angaraes - Huancavelica y distrito de Santillana de la provincia Huanta – Ayacucho.

1.3.2. Objetivos Específicos.

- Determinar los perfiles moleculares de la diversidad genética de papas (*Solanum spp.*), procedentes de los distritos de Secclla, Santo Tomás de Pata y Santillana.
- Comparar la variabilidad de los marcadores moleculares microstaélites de la diversidad genética de papas (*Solanum spp.*), procedentes de los distritos de Secclla, Santo Tomás de Pata y Santillana.
- Estimar las distancias genéticas entre los marcadores moleculares microstaélites de la diversidad genética de papas (*Solanum spp.*), procedentes de los distritos de Secclla, Santo Tomás de Pata y Santillana.

1.4. Justificación

Las bondades del uso de los microsatélites como marcadores moleculares, por tener secuencias cortas de di, tri o tetranucleótidos que están distribuidos en tándem a lo largo del genoma, siguen una herencia mendeliana, no son afectados por factores ambientales, son de carácter codominante y tienen alta tasa polimórfica. Estas secuencias son detectadas mediante PCR con el uso de iniciadores específicos, separación en geles de poliacrilamida y tinción con fluorómetro infrarrojos. Estas caracterizaciones moleculares aportarán datos con alta especificidad, para el análisis de la diversidad genética de *Solanum spp.*, aun cuando estos pudieran tener mucha similitud morfológica no conduce a un error de identificación. La obtención de la secuencia completa de

cada variedad de *Solanum* spp., de los distritos de Seclla y Santo Tomás de Pata de la provincia de Angaraes - Huancavelica y del distrito de Santillana de la provincia de Huanta Ayacucho, que permitirá la identificación de genes o grupos de genes responsables de las características de la planta, además de su localización física en el genoma, información que facilitará a los mejoradores la manipulación de muchos más caracteres para la selección y desarrollo de la biodiversidad de las variedades de papas en forma más eficiente.

La importancia, el impacto y los beneficios iniciales se podrá notar a nivel de investigadores dedicados a la genómica, biología molecular de plantas y mejoramiento genético, utilizando tecnología moderna, específicamente aquellos dedicados al mejoramiento de *Solanum* spp., en segundo lugar estos resultados podrán transferirse a los Centros de Investigación de este cultivo; los que podrán ser utilizados en un programa de mejoramiento genético de la papa de acuerdo a las necesidades de cada región, en este caso las regiones de Huancavelica y Ayacucho. La ejecución del proyecto fue factible técnica y logísticamente, por contar con el Centro de Investigación de Biología Molecular y Bioinformática en la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga (UNSCB), el mismo se encuentra operativo y se encuentra al servicio de los investigadores, además es económicamente viable su ejecución.

CAPÍTULO II MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes de la investigación

La región del lago Titicaca sería el centro de origen de la papa cultivada debido a la existencia de un gran número de especies, al igual que de variedades cultivadas⁷. Se presume que la papa fue domesticada hace unos 10,000 años por la mujer andina cuando el hombre se dedicaba a la caza y pesca se puede decir con certeza que este cultivo ha sido la base de las civilizaciones y culturas andinas⁸. En los primeros estudios sobre el origen de las papas domesticadas hubo discrepancias entre los diferentes investigadores que abordaron el tema y principalmente se postularon dos teorías: La primera sostiene que es posible la existencia de dos centros de domesticación, como fue descrito por Vavilov en 1951. Esta teoría es apoyada por la escuela rusa con Bukasov a la cabeza, y sostiene que deben existir dos centros de origen, uno principal, situado en el macizo andino peruano-boliviano y el otro secundario, que comprende el Sur de Chile y Chiloé. La segunda teoría apoyada por Hawkes, reconoce la existencia de un solo centro de domesticación comprendida por la región sur del Perú y norte de Bolivia; por consiguiente la papa se dispersó al centro y norte del Perú, alcanzando por el norte hasta Colombia y por el sur hasta Chile⁹. En los últimos años, los estudios genéticos, bioquímicos y moleculares han corroborado la teoría de la existencia de un solo centro de domesticación ubicado en la región peruana-boliviana^{10, 11}.

Es de aceptación general que la papa es originaria de América, pero durante mucho tiempo se discutió su centro de origen. Si bien hay restos de cerámica y figuras preincaicos que confirman que hace 7,000 años los primeros pobladores peruanos horticultores iniciaron la domesticación de la papa, es recién en 2005 que el botánico David Spooner del Servicio de

Investigación Agrícola, colaboradores del Instituto Escocés de Investigación en Cultivos y Científicos del Centro Internacional de la Papa concluyeron que el punto de origen único de las papas cultivadas era el norte del lago Titicaca, en el sur peruano¹².

La mayor diversidad genética de papas (*Solanum tuberosum* L.), silvestre y cultivada, se encuentra en las tierras altas de los Andes. En el mundo se cultivan cerca de 5000 variedades de papa. La primera crónica conocida que menciona la papa fue escrita por Pedro Cieza de León en 1538. En su descripción de la larga marcha a través del territorio andino, relata las costumbres alimenticias basadas en la papa. La papa se desarrolló y se cultivó por primera vez en las vecindades del Lago Titicaca, cerca de la frontera actual entre Perú y Bolivia, según los documentos arqueológicos y etnológicos disponibles, las poblaciones andinas empezaron a comer patatas silvestres 3.000 a 4.000 años antes de nuestra era. Las poblaciones preincaicas daban usos diferentes a las papas, las colocaban crudas para sanar los huesos rotos, para prevenir el reumatismo y las comían mezcladas con otros alimentos para mejorar la digestión. Además de lo anterior, se usaban para medir el tiempo relacionándolo con el desarrollo del cultivo. Las papas nativas son el resultado de un proceso de domesticación, selección y conservaciones ancestrales, herencia de los antiguos habitantes de nuestros Andes. Las papas nativas ecuatorianas presentan diversidad de formas, colores y tamaños. Existen papas de formas aplanadas, redondas, comprimidas, alargadas, con ojos profundos; de colores de piel amarilla, roja, rosada o morada, que en algunos casos se combinan en diseños vistosos y originales. A diferencia de las papas mejoradas, las variedades nativas tienen un mayor contenido de sólidos por lo que son más nutritivas y dan un sabor especial a los preparados. El elevado contenido de carotenoides, flavonoides y antocianinas (sustancias antioxidantes naturales) hacen de estas variedades un producto único en el mundo¹³.

En el Perú hay una gran diversidad cultural que está ligada a la conservación de la biodiversidad. El proyecto denominado “Conservación *In situ* de los cultivos nativos y sus parientes silvestres”, dentro de ellos la papa, fue utilizado dentro de este proyecto para estimar el grado de diversidad y variabilidad que presentan dentro de las chacras de los campesinos conservacionistas. Siempre existe pérdida e incremento de variedades; la posesión de variedades y especies por tanto no es una cuestión estática, por el contrario, es muy dinámica y no siempre se da a la vista de todos. Los inventarios se presentan en bases de datos, los cuales muestran que existe una fluctuación tanto a nivel de diversidad y variabilidad. Se fundamenta la dinámica de la conservación *in situ* en función a los mecanismos de provisión e intercambio de semillas, del mismo modo se reconocen en las prácticas tradicionales como las más

apropiadas. Otro aspecto importante es que no es posible mantener “demasiadas” variedades, puesto que al existir tantas, no todos sus usos son conocidos ni todas pueden ser agradables para las comunidades o en todo caso no todas las variedades mantienen su rendimiento, por lo que se conservan aquellas que mantienen su vigor por más años^{14,15}.

La mayor limitante de cualquier estrategia de conservación para salvaguardar la diversidad genética y con ello el potencial adaptativo de una determinada especie, es el nivel de caracterización de dicha diversidad, la cual se ha basado en la mayoría de los casos en rasgos morfológicos, los cuales se limitan al fenotipo (expresión del genotipo) que puede ser afectado por el ambiente, restringiendo de este modo el análisis de la diversidad genética¹⁶.

Como alternativa para superar estas limitaciones surgen los marcadores moleculares, que son secuencias del ADN que pueden ser usadas para analizar mínimas variaciones genotípicas (polimorfismos) sin la intervención de factores ambientales, además tienen la ventaja de poder cubrir todo el genoma y de ser relativamente fijos o perennes. Son usados con muchos propósitos, entre ellos están los estudios taxonómicos, filogenéticos, evolutivos, rutas de domesticación, mejoramiento, conocer el “pool génico” completo de un cultivo o la diversidad genética, distancias genéticas, variabilidad existente, estudiar las relaciones entre diversidad y ambiente⁹. En el caso de la papa, se puede observar la existencia de varios estudios realizados con marcadores moleculares y bioquímicos. Los primeros trabajos en el Perú fueron realizados por el CIP, donde se utilizaron marcadores RAPD para analizar la diversidad genética de *Solanum tuberosum* y la construcción de una Colección núcleo¹⁷. Los marcadores moleculares RAPD, son secuencias de ADN amplificadas por un iniciador arbitrario y aunque son de bajo costo y no necesitan conocimientos especiales del genoma a analizar tienen como desventaja su bajo valor informativo debido a su naturaleza dominante y su falta de reproducibilidad, esto hace difícil la comparación de resultados entre diferentes centros de investigación¹⁸.

Para el caso de la papa, los microsatélites vienen siendo usados en los últimos años. Provan (1996) fue uno de los primeros en estudiar el potencial de los microsatélites para el análisis de la diversidad genética de cultivares de papa. Por otro lado, Milbourne y colaboradores en 1997 compararon la eficiencia de tres marcadores basados en PCR para diferenciar variedades de papa tetraploide llegando a la conclusión que los microsatélites presentaban mayor polimorfismo y mayores ventajas que los AFLP y RAPD. En el Perú, en el año 2001 Ghislain y colaboradores en el CIP, lograron seleccionar 18 iniciadores para secuencias microsatélites de papa, con un alto grado informativo (alta resolución del producto amplificado, localización en el genoma y

polimorfismo elevado), con el fin de usarlos para caracterizar de manera rápida y eficiente diversas variedades de papa cultivadas y silvestres¹⁹.

A nivel regional, nacional e internacional existen estudios de microsatélites o secuencias simples repetidas (SSR), conducidos por el CIP, universidades e instituciones científicas que se dedican a la investigación de la diversidad de papas en diferentes regiones de nuestro país, especialmente en las poseedoras de papas nativas como Huancavelica y Ayacucho, que se hace referencia como antecedentes:

Guzman et al²⁰, en el estudio de avances en la caracterización molecular de las papas nativas del departamento de Ayacucho utilizando marcadores microsatelites, encontraron diferencias en microsatélites en los cultivares.

Gonzales y Peña²¹, en el estudio del análisis de la diversidad genética de *Solanum sp.* “papas nativas” mediante Polimorfismo en la Longitud de Fragmentos Amplificados (AFLP) del distrito de Chungui, provincia La Mar – Ayacucho, encontraron diferencias en un total de 63 bandas polimórficas, las cuales fueron claramente diferenciables, lo que permitió diferenciar los morfotipos. El cultivo de las papas nativas presenta una alta diversidad genética con una llamativa variedad de colores tanto en flores, como en tubérculos que varían en intensidad, combinaciones y tonalidades de colores.

Gamboa²², en el estudio de determinación de la diversidad genética mediante marcadores AFLPs en morfotipos de “papas nativas” del distrito de Anco, provincia La Mar- Ayacucho, llegó a determinar la diversidad genética, encontrando que hay dos grupos (C y D), cada una con un morfotipo de entrada, los cuales difieren en comparación a los grupos (A, B y E) a un coeficiente de similitud de 0.65 para SM, que determina que hay diversidad genética en papas nativas del distrito Anco.

Tincopa²³, en su tesis para obtener el grado de magister (UNMSM), establecimiento de un índice de genes en *Ipomoea batatas* (L.) Lam. Usando secuenciamiento 454 a partir de bibliotecas de cDNA y desarrollo de marcadores microsatélites, menciona que se ha identificado un gran número de secuencias candidatas para marcadores microsatélites y se han diseñado iniciadores para la amplificación de esas secuencias a partir del índice de genes de *Ipomoea batatas* (L.) Lam. Se diseñaron 233 pares de iniciadores, de los cuales 195 han amplificado exitosamente sólo un locus de microsatélites, 150 de esos loci fueron polimórficos en los 8 genotipos de camote seleccionados.

Martínez²⁴, en el estudio de ubicación de secuencias genómicas de *Solanum phureja* en un mapa genético utilizando marcadores microsatélites (Tesis en la UNMSM), Se construyó un mapa de ligamiento

basado netamente en microsatélites para la especie de *Solanum tuberosum* Grupo *Phureja* constituido por 12 grupos de ligamiento. Además se logró incorporar 37 nuevos microsatélites al mapa genético de la papa.

Torres¹⁹, en su tesis de pregrado (UNMSM), Integración de marcadores microsatélites en el mapa ultradenso de *Solanum tuberosum* y su comparación con el de *Solanum phureja*. Llega a la conclusión que los 62 loci microsatélites integrados en el mapa UHD de *Solanum tuberosum* son marcadores “puente” muy informativos para la cartografía comparativa y la integración de mapas genéticos de diferentes poblaciones. La comparación de los mapas genéticos revela que (*Solanum tuberosum*) y (*Solanum phureja*) conservan en su totalidad la presencia y el orden de marcadores en largos segmentos de los cromosomas.

Ponce²⁵, en su tesis de pregrado (UNMSM), en caracterización molecular de las variedades de papas cultivadas (*Solanum spp.*) más importantes del Perú mediante el uso de microsatélites, menciona que los 23 marcadores microsatélites utilizados han demostrado ser útiles para la caracterización genética molecular de las variedades de papas cultivadas más importantes del Perú (*Solanum spp.*) y el alto número de alelos compartidos entre las regiones del Norte, Centro y Sur concluyendo que existe un acervo genético común ampliamente distribuido, donde la variación genética interregional se da entre Centro y Norte y las variedades nativas poseen mayor diversidad genética que las mejoradas (riqueza alélica y disimilitud).

Alvarado⁹⁷, en su tesis de pregrado (UNMSM), en caracterización fenotípica y molecular de la diversidad genética de papas cultivadas por su tolerancia al endulzamiento en frío”, encontró que los contenidos de información polimórfica PIC variaron desde 0.361 hasta 0.848. Determinó con 4 iniciadores multiloci: S011, S042, S095 y S101. El agrupamiento de individuos se realizó mediante promedios aritméticos no ponderados entre grupos por pares UPGMA (NTYSYSpc 2.02h), realizó un análisis de agrupamiento obteniendo para el sistema de marcadores SSR un valor de similitud que varía desde 0.262 a 0.964 para los 40 cultivares nativos de papa.

Soto et al¹¹⁷, al analizar el grado de diversidad genética utilizando 18 marcadores microsatélites, de una muestra aleatoria de 79 variedades nominales de papa nativa (*Solanum spp.*) procedentes de cinco regiones políticas del Perú (Ayacucho, Cajamarca, Cusco, Huancavelica y Puno). Los valores de polimorfismo (PIC = 0.55 – 0.85) y los índices de diversidad genética obtenidos indicarían que los microsatélites evaluados lograron identificar altos niveles de diversidad genética, pero a la vez no son suficientes para discriminar grupos diferenciados por procedencia o

especies. Sus análisis indican que existe un alto grado de diversidad genética y corroboran los resultados obtenidos de los inventarios y caracterizaciones morfológicas realizadas *in situ*; también concluyen que existiría un pool de genes común que se encontrarían ampliamente distribuidos entre las regiones estudiadas.

Roca¹³⁶, menciona que el departamento de Junín es conocido por ser uno de los lugares con mayor diversidad de papa cultivada en el Perú, sus variados rangos de climas y ecosistemas ha permitido la adaptación y la proliferación de una gran diversidad de papas. Sin embargo esta diversidad no ha sido completamente estudiada en el campo y es necesario investigaciones sistemáticas que permitan estimar la verdadera diversidad existente en el campo y así poder diferenciar está en posteriores años. La caracterización genética utilizando marcadores microsatélites (SSR) se realizó en 444 cultivares de papas nativas de la región sur oeste del departamento de Junín, 7 comunidades de la región fueron estudiadas junto con los agricultores. Se utilizaron 21 pares de iniciadores SSR presentándose 158 bandas polimórficas para toda la población. Encontró valores de heterocigocidad entre 0.64 y 0.70 siendo el promedio para las comunidades de 0.67. Los agrupamientos por disimilitud permitieron observar que no existe una agrupación específica por comunidades, siendo la diversidad entre estas distinta y diversas. Esta última observación se corroboró en el análisis AMOVA, que permitió comprender que la diversidad entre las comunidades en base a sus frecuencias alélicas es baja, sin embargo dentro de cada comunidad es alta.

Mathias²⁶, en el estudio del uso de marcadores SSR para identificación de germoplasma de papa en el programa de mejoramiento de INIA de Chile, menciona que los marcadores moleculares basados en Secuencias Simples Repetidas (SSR) constituyen una herramienta altamente eficaz para la identificación de genotipos de papa (*Solanum tuberosum* L.) y es de gran utilidad en la conservación y manejo de germoplasma. Con el propósito de incorporar esta tecnología al Programa de Mejoramiento de Papa del Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA) de Chile, se evaluó un grupo de 26 marcadores SSR sobre una muestra de 71 genotipos de papa. Cada marcador se caracterizó según su número de alelos y sus respectivas combinaciones, calidad de lectura, contenido de información polimórfica (PIC) y poder discriminatorio (D). Del total sólo 21 marcadores SSR mostraron productos legibles con un número de alelos que varió entre 2 y 17.

Osorio²⁷, en el estudio de las condiciones para la amplificación de microsatélites en cultivares de papa, menciona que es de suma importancia para el manejo de bancos de germoplasma, programas de mejoramiento genético, análisis de diversidad genética, procesos de

micropropagación y producción de semilla. Por su alto grado de polimorfismo, los microsatélites (SSR) han demostrado ser una herramienta muy poderosa para análisis de variabilidad, además es reproducible.

Osorio²⁸, en el estudio de la diversidad de cultivares nativos de papa de la región andina venezolana, mediante microsatélites. Los productos de amplificación obtenidos, permitió separar los 22 individuos nativos colectados en la región andina venezolana en 6 grupos definidos por los códigos de genotipificación por segregación, donde 20 de ellos quedaron agrupados en cuatro de los códigos definidos mientras que “Reinosa.” y “Montañita”, por el número de bandas descritas y su desplazamiento en el gel, describieron códigos exclusivos ubicándose como materiales únicos, como en la denominación que han recibido por parte de los agricultores que los multiplican y conservan.

Cadima et al²⁹, en el estudio del uso de marcadores moleculares microsatélite para el análisis de la diversidad genética de papa nativa de Bolivia, los resultados indican la presencia de 327 alelos diferentes para los 22 microsatélites amplificados en las seis especies de papa evaluadas. Se distinguen los resultados por especie en cuanto a número de variantes alélicas, rango de pares de bases y número de alelos únicos encontrados en cada caso. La mayor diversidad presenta *Solanum tuberosum Subsp. andigena*, por la cantidad de alelos detectados.

Orona¹²⁸, analizó 17 variedades comerciales y ocho líneas avanzadas de papa colectadas en los bancos de germoplasma del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, ubicados en Emiliano Zapata, Municipio de Saltillo, Coahuila y en Texcoco, Estado de México. La caracterización molecular del germoplasma se realizó utilizando las técnicas del DNA Polimórfico Amplificado al Azar (RAPD) y la de Secuencias Simples Repetidas (SSR) también conocida como microsatélites. Con las dos técnicas utilizadas en este estudio (RAPD y SSR) se pudieron diferenciar todos los materiales evaluados, obteniéndose su huella genética.

Cortez³⁹, complementó la caracterización molecular de 688 accesiones de la subespecie *andigena*, utilizando 20 marcadores microsatélites. Realizó el escalamiento multidimensional con la información molecular, realizando la correlación de las dimensiones obtenidas, con la información morfológica y evaluaciones agronómicas. También realizó el análisis de coordenadas principales, complementando con el análisis con la información de evaluaciones agronómicas. Concluyendo que existe alta diversidad genética de la subespecie *andigena* en las accesiones bolivianas. El análisis mediante 20 microsatélites confirmó esta diversidad. Las especies mantienen su identidad genética y se muestra

una tendencia a formarse grupos de similitud. Solo se ha encontrado 4 casos eventuales de probable duplicidad.

Onamu et al¹¹³, mencionan que en México hay gran diversidad de papas (*Solanum tuberosum* L.), al analizar mediante RAPD e ISSR para estudiar la diversidad genética y estructura poblacional en quince cultivares de papa (9 mejorados de Europa, Estados Unidos de América y México, y 6 criollos mexicanos) sembrados en México. El coeficiente de similitud más alto (0.89) detectaron entre los cultivares Fianna y Armada. En contraste, el coeficiente de similitud más bajo (0.55) se obtuvo entre Tollocan y Cambray Rosa Morelos. El alto nivel de diferenciación genética entre cultivares ($GST = 0.71$) y bajos valores de flujo genético ($Nm = 0.19$) a través de todos los loci indicaron que el nivel de divergencia genética entre los 15 cultivares es alta. El análisis de varianza molecular reveló una contribución significativa de las diferencias entre regiones, entre cultivares, entre y dentro de las poblaciones, a la diversidad genética total de los cultivares estudiados.

Sánchez⁶³, en el trabajo de variabilidad genética de 30 accesiones de papa nativas (*Solanum tuberosum* L.) del banco de germoplasma que administra la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (Corpoica), mediante cinco marcadores moleculares microsatélites (SSRs). En total, se identificaron 33 alelos con un rango entre 2 (STMS1049) hasta 10 (STMS1106), donde el contenido de información polimórfica (PIC) varió entre 0,368 (STM1049) hasta 0,574 (STM2022). El análisis de agrupamiento distribuyó las 30 accesiones de papas en siete grupos genéticos, con índices de similitud que oscilaron entre 0,452 hasta 0,841. A partir de los resultados obtenidos se puede concluir que con el uso de los marcadores moleculares empleados el material presentó variabilidad, poniendo en manifiesto el gran valor que tiene esta colección para los programas de mejoramiento genético de la especie.

La papa es una planta herbácea que produce tubérculos como parte de su sistema de tallos, siendo éstos los principales órganos de almacenamiento. La papa pertenece a la familia *Solanacea*, conformada por más de 3000 especies. El género *Solanum* (dividido en siete subgéneros) es uno de los más importantes económicamente dentro de esta familia, que incluye a especies como papa (*Solanum tuberosum* L.), tomate (*S. lycopersicum*), berenjena (*S. melongena*), ajíes, pimientos y otras frutas menores como el pepino (*S. muricatum*), y el aguaymanto. Dentro de este género, las papas silvestres y cultivadas se encuentran en el subgénero *Potatoe*, en la sección *Petota* que comprende aproximadamente 188 especies silvestres y 7 especies cultivadas³⁰.

La mayor parte de las 188 especies de papas silvestres son raras y endémicas, y están distribuidas en 16 países, desde el sur oeste de los

Estados Unidos hasta la costa central de Chile. Las papas cultivadas nativas crecen principalmente en los Andes, desde Venezuela hasta Argentina, y en la parte central de Chile. Entre las especies silvestres y cultivadas, se encuentran marcadas diferencias morfológicas. Estas diferencias también son muy notables entre las especies cultivadas y dentro de cada una de ellas. La morfología de la papa puede ser afectada por factores ambientales como la temperatura, el fotoperíodo, humedad y la fertilidad del suelo³¹.

El Perú es el país con mayor diversidad de papas en el mundo, al contar con 8 especies nativas domesticadas y 2,301 de las más de 4,000 variedades que existen en Latinoamérica. Además, nuestro país posee 91 de las 200 especies que crecen en forma silvestre en casi todo nuestro continente (y que generalmente no son comestibles)³².

La papa nativa, oriunda de los andes peruanos, ha llegado a nuestros días con sus diversas formas y múltiples colores gracias al cuidado y dedicación de los agricultores altoandinos que han preservado por muchos años una extraordinaria diversidad de formas, colores, sabores y texturas de este importante tubérculo desde épocas incaicas y predecesores. La papa nativa, con sus cientos de variedades, así como los conocimientos y técnicas ancestrales asociados al cultivo y el manejo del paisaje agrícola. Tesoro potencial que recién empieza a ser valorado por su gran potencial nutritivo y propiedades nutraceuticas, por lo cual es importante la incorporación de este producto en cadenas de valor con la finalidad de conservar su biodiversidad y darle mayor valor agregado^{33, 34}.

La papa (*Solanum tuberosum*) es considerada el tercer alimento de mayor importancia a nivel mundial después del trigo, y el arroz (FAOSTAT, 2012)³⁵. La especie de papa más cultivada en el mundo corresponde a *Solanum tuberosum* L. ($2n = 4x = 48$). Esta especie contiene dos grupos de papas cultivadas, el grupo Chilotanum que involucra papas tetraploides desarrolladas en bajas altitudes y el grupo Andigenum que reúne papas con diferentes niveles de ploidía y cultivadas en las montañas andinas. Dentro del grupo Andigenum se encuentra un subgrupo de papas primordialmente diploides ($2n = 2x = 24$) y con carencia de dormancia en el tubérculo, de día corto y periodo vegetativo mediano (120 días) anteriormente denominado como especie *Solanum phureja* o grupo cultivado "Phureja"^{33, 36, 37, 38}.

La papa ha sido domesticada aproximadamente unos 8 mil años a. C., en los Andes de Perú y Bolivia. Actualmente en la región Andina aún existe una amplia diversidad de cultivares nativos de papa concentrados en microcentros de diversidad mantenidos por familias campesinas conservacionistas^{29, 36}.

Tabla 1. Clasificación citológica y taxonómica de la papa

PLOIDIA	HAWKES (1990)	OCHOA (1999)	HUAMÁN Y SPOONER (2002)
2x	<i>S. ajanhuiri</i>	<i>S. x ajanhuiri</i>	<i>Solanum tuberosum</i>
	<i>S. stenotomum</i>	<i>S. goniocalyx</i>	Grupo <i>ajanhuiri</i>
	<i>S. phureja</i>	<i>S. stenotomum</i>	Grupo <i>stenotomum</i>
		<i>S. x phureja</i>	Grupo <i>phureja</i>
3x	<i>S. chaucha</i>	<i>S. x chaucha</i>	Grupo <i>chaucha</i>
	<i>S. juzepczukii</i>	<i>S. x juzepczukii</i>	Grupo <i>juzepczukii</i>
4x	<i>S. tuberosum</i>	<i>S. tuberosum</i>	
	Subsp. <i>Andigenum</i>	Subsp. <i>Andigenum</i>	Grupo <i>andigenum</i>
	Subsp. <i>Tuberosum</i>	Subsp. <i>Tuberosum</i>	
		<i>S. hygrothermicum</i>	
5x	<i>S. curtilobum</i>	<i>S. curtilobum</i>	

Fuente: Gutiérrez⁴⁰

La colección de papa que actualmente cuenta con más de 1600 accesiones de siete especies cultivadas (*S. tuberosum* Subsp. *andigena*, *andigena*, *S. phureja*, *S. goniocalyx*, *S. stenotomum*, *S. x ajanhuiri*, *S. x curtilobum* y *S. x juzepczukii*), fue caracterizada morfológicamente y evaluada por sus cualidades agronómicas^{29, 32, 36, 39}. Teniendo los recursos genéticos al alcance nuestro y siendo necesario los estudios de papas nativas a través de los marcadores moleculares microsatélites es de suma importancia para el mejoramiento genético y conocer las semejanzas y diferencias entre los cultivares nativos.

2.2. Bases teóricas

2.2.1. Aspectos evolutivos de las papas cultivadas

Las primeras papas cultivadas fueron seleccionadas entre 7,000 y 10,000 años atrás por pobladores de los Andes, según los datos obtenidos con radiocarbono de restos fósiles de papas encontradas en el Cañón de Chilca de la sierra peruana⁴¹. A partir de dicha selección se generaron una gran cantidad de variedades cultivadas. Este proceso, cuando no se dio espontáneamente en la naturaleza, habría sido llevado a cabo deliberada o inconscientemente por el poblador altiplánico⁴².

Diversos estudios citogenéticos demuestran la existencia de una serie poliploide, con número basal $x = 12$, tanto en especies de papas silvestres como cultivadas. Esta serie poliploide varía desde las diploides ($2n = 2x = 24$) hasta pentaploides ($2n = 5x = 60$). La presencia de diploides en especies silvestres y cultivadas, sumado a la enorme cantidad de especies diploides en comparación con los demás grupos poliploides;

sugiere que la evolución de estas especies ha sido desde las diploides hasta las pentaploides. Por tanto, las especies diploides serían las más primitivas y las pentaploides las más recientes (Vásquez, 1988 citado por Soto⁹). La mayor parte de las especies silvestres presentan estolones largos, al final de los cuales se encuentran a los tubérculos. El tamaño de estos tubérculos varía desde unos cuantos milímetros (*S. clarum*, *S. morelliforme*) hasta varios centímetros, comparable con las especies cultivadas (*S. burtonii*, *S. candolleianum*). De igual modo su morfología varía desde tubérculos globosos hasta tubulares, ya sean rectos o curvos, y con varias formas intermedias⁴³.

La dinámica evolutiva de las especies de papa cultivada, según Hawkes (1994)⁴⁸, empezó con la especie diploide *S. stenotomum*, considerada la más primitiva de las papas cultivadas, la cual posiblemente se derivó de las especies silvestres diploides *S. leptophyes* o *S. canasense*, distribuidas en la misma región que ahora ocupa *S. stenotomum* (Figura 1).

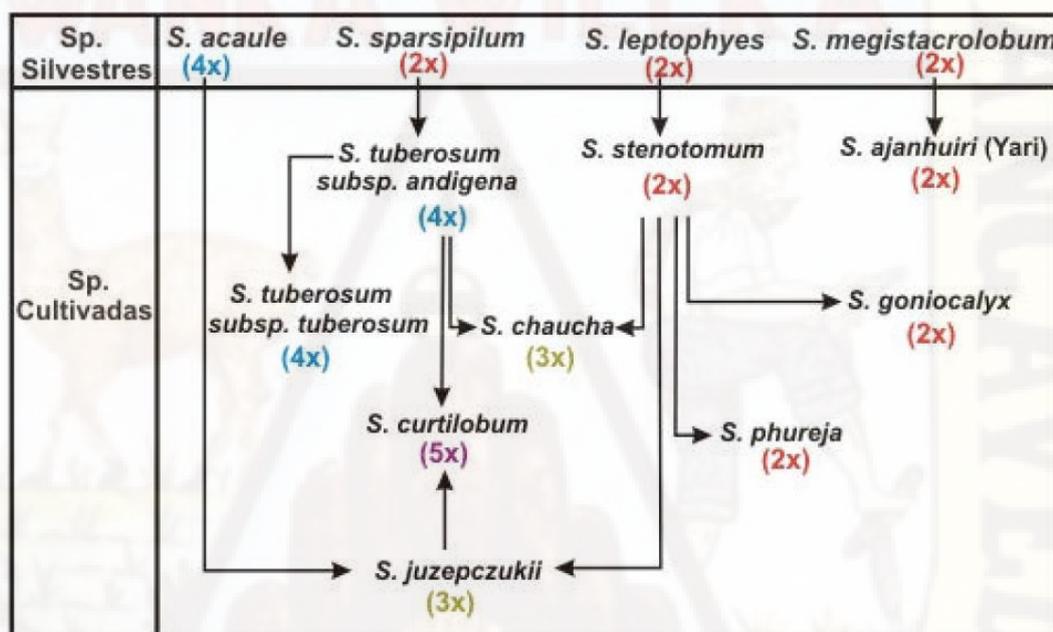


Figura 1. Relaciones evolutivas de las papas cultivadas con sus ancestros silvestres y sus niveles de ploidia (Adaptado de Hawkes, 1990)¹⁰.

Una de las tendencias morfológicas selectivas en la domesticación de la papa fue la reducción de la longitud de los estolones, lo que favoreció la concentración de los tubérculos al pie del tallo y por lo tanto una menor demanda de tiempo y energía para su recolección. Asimismo, en su domesticación pudo estar implicada la selección de tubérculos menos tóxicos y con menores niveles de glicoalcaloides. En cuanto a la forma y color de los tubérculos los agricultores andinos mantuvieron una mayor variedad en las especies cultivadas con respecto a los observados en las

especies silvestres. Finalmente, se seleccionaron poblaciones con madurez temprana (precocidad), periodo de dormancia adecuado y resistencia a diferentes tipos de estrés abiótico, buscando siempre tubérculos de mejor sabor, mayor tamaño y producción. Estas características mencionadas son comunes en todas las especies de papa cultivada, a pesar del gran polimorfismo que existe entre ellas^{43, 44, 45, 46,47}.

Una hibridación natural de *S. stenotomun* con la especie silvestre *S. sparsipilum*, seguida de una duplicación cromosómica habría producido la especie tetraploide *S. tuberosum subsp. andigena* en los Andes centrales¹⁰³. Sin embargo algunos investigadores consideran que las papas tetraploides andinas se habrían originado solo de *S. stenotomun* por simple duplicación cromosómica. Esta subespecie tetraploide fue llevada al sur de Chile por los antiguos habitantes andinos, donde empezó a adaptarse a días largos, allí fue donde evolucionó hacia la *subsp. tuberosum*. Probablemente en el trayecto desde los Andes centrales hacia las tierras bajas chilenas fue donde se dio origen a *S. tuberosum subsp. tuberosum* por medio de la hibridación de *S. tuberosum subsp. andigena* (como progenitor masculino) con una especie silvestre boliviana o argentina de *S. tarijense*, poseedora de factores para la esterilidad citoplásmica^{10, 104}.

En cuanto a *S. goniocalix* surgió como una variante de *S. stenotomun*, presentando una alta diversidad desde el norte del Perú hasta el centro de Bolivia. Otra especie derivada de *S. stenotomun* por un proceso de selección artificial es *S. phureja* que se caracteriza por haber perdido su periodo de dormancia al momento de la cosecha, rápido desarrollo de los tubérculos y mejor desarrollo del cultivo. Esto le permitió a los agricultores obtener hasta tres cultivos por año en las zonas bajas y cálidas de los valles orientales de los Andes. Actualmente, *S. phureja* se distribuye ampliamente en una larga y estrecha franja de los Andes, desde Venezuela hasta el centro de Bolivia, mientras *S. stenotomun* está restringida solo a Perú y Bolivia^{10, 25}. Por otro lado, la hibridación natural de *S. stenotomun* con la especie diploide resistente a las heladas *S. megistracrolobum* produjo la especie *S. ajanhuiri*, una papa amarga cultivada en una estrecha región alrededor del lago Titicaca¹⁰⁵.

La hibridación entre *S. stenotomun* y la especie tetraploide silvestre *S. acaule* produjo el híbrido triploide estéril *S. juzepczsukii*, que incorporó la alta resistencia a las heladas de *S. acaule*. Una posterior hibridación entre *S. juzepczsukii* y *S. t. subsp. andigena* produjeron al híbrido poco resistente al frío denominado *S. curtilobum*. Para que se diera este híbrido tuvo que involucrar a un gameto no reducido ($2n$) de *S. juzepczsukii* y un gameto normal (n) de *S. tuberosum subsp. andigena*. Una serie de cruces naturales entre *S. stenotomun* y *S. tuberosum subsp. andigena* dieron lugar al híbrido triploide denominado *S. chaucha*. La distribución de estos

híbridos, comprende una vasta región de los andes centrales entre Perú y Bolivia⁷.

Recientemente Rodríguez et al., (2010)¹⁰⁶ usando datos de la secuencia de genes waxy (relacionado con la síntesis del almidón) han validado esta dinámica evolutiva sobre el origen híbrido de las papas cultivadas, con la observación de que en algunas muestras pertenecientes a *S. tuberosum* Grupo Chilotanum (*S. tuberosum subsp. tuberosum*) aparentemente se habrían hibridado con la especie silvestre *S. maglia*.

2.2.2. El cultivo de papa y su importancia

El cultivo de la papa se lleva a cabo en la mayoría de los países, en más zonas ecológicas, y más sistemas agrícolas que cualquier otro cultivo en el mundo⁴⁹.

La sociedad utiliza cerca de 10 000 especies vegetales distintas para producir alimentos y piensos desde el inicio de la agricultura, hace 10 000 años.

Sin embargo, hoy en día sólo 150 cultivos alimentan a la mayoría de la población del planeta y apenas 12 cultivos proporcionan el 80 por ciento de la energía alimentaria. El 60 por ciento de esta energía procede exclusivamente del trigo, el arroz, el maíz y las papas⁵⁰. El contenido químico es superior a estos cultivos en producción de proteína y energía por unidad de tiempo y hectárea. Su contenido proteínico es valioso debido al alto contenido de aminoácidos esenciales, lo cual no es común en las proteínas de otras plantas, excepto la soya. Además es una fuente importante de vitamina C y de minerales, especialmente potasio⁸.

La papa (*Solanum Tuberosum*), en la sierra se cultiva desde los valles inter andinos profundos y calurosos hasta las zonas altas y frías; en general es cultivada desde el nivel del mar hasta los 4200 metros de altura⁵¹. Los agricultores cultivan la papa considerando las siguientes categorías: i) variedades nativas; ii) variedades nativas seleccionadas, aquellas sembradas individualmente para su comercialización por ser de muy buena calidad culinaria (harinosas); iii) variedades amargas, para su uso en forma de chuño o moraya y iv) variedades modernas o también llamadas mejoradas (Brush, 1991; Quiros et al., 1992), mencionado por Rojas (2007)⁵².

La diversidad de los cultivos tiene que conservarse por su utilidad actual o potencial y porque es una garantía para el mejoramiento de la especie. Hay muchas evidencias de la pérdida de la diversidad de los cultivos; es verdad que esa pérdida todavía no es catastrófica en los países que fueron asiento de culturas ancestrales, pero es necesario estar preparado para enfrentar las amenazas, corregir las causas y remediar sus efectos. La diversidad de los cultivos se puede conservar ex situ o in situ. La

conservación ex situ se hace en cámaras acondicionadas con control de humedad y temperatura, en jardines botánicos, estaciones experimentales o cualquier otro ambiente que permita el mantenimiento de las semillas sin variar su capacidad reproductiva ni su constitución genética. De acuerdo a la Convención de la Diversidad Biológica, la conservación in situ de la diversidad de los cultivos se realiza en los hábitats donde las especies cultivadas han desarrollado sus propiedades distintivas⁴³.

Los sistemas tradicionales de conservación basados exclusivamente en la reproducción vegetativa de genotipos sean en parcelas de agricultores, como conservación in-situ, o en “Bancos de Genes” mediante cultivo de tejidos para conservación ex-situ; permite retener características y combinaciones genéticas seleccionadas por los agricultores. La gran diversidad genética que generalmente resulta de estas semillas permite la selección de nuevos cultivares de acuerdo con las necesidades y preferencias de los agricultores y representa una estrategia de conservación in-situ tecnológica y económica aceptada por las familias conservadoras de papas nativas⁴⁵.

La ONU destaca que la papa es un alimento de primera necesidad en la dieta de la población mundial, y el papel que ella puede cumplir para proporcionar seguridad alimentaria y erradicar la pobreza. La papa es el más importante del mundo, se siembra en más de 125 países y más de un billón de personas alrededor del mundo la consumen. Se ha convertido en la mejor fuente de carbohidratos de la dieta de los pobladores de muchos países en desarrollo. Para los agricultores pobres de los países en desarrollo, el mejoramiento del rendimiento es esencial para alcanzar independencia económica y seguridad alimentaria, entre los múltiples factores que afectan a los rendimientos, los investigadores otorgan la máxima prioridad al estrés causado por las plagas y enfermedades y a la limitada capacidad de las variedades actuales de papa para hacerles frente. Los científicos están tratando de desarrollar cultivos que requieran menos agua, dado a la escasez del recurso, en muchas formas, la papa es ideal, porque produce más alimento por unidad de agua que cualquier otro cultivo principal. En términos generales, el desarrollo de semillas de papa libres de enfermedades y de variedades resistentes a virus, plagas, sequía e inclemencias climáticas, así como los programas de manejo integrado tendrán valiosos beneficios para el medio ambiente al reducir drásticamente la necesidad de usar agroquímicos, minimizando la amenaza de la agricultura al medio ambiente en deforestación, erosión de los suelos y contaminación acuática⁵³.

El cultivo de papa en el Perú está extendido en 19 regiones, desde el nivel del mar hasta los 4,500 msnm.; su superficie aproximada de siembra a nivel nacional es de 260,000 hectáreas las cuales producen más de 3 millones de toneladas, generando aproximadamente 110,000 puestos de

trabajo permanentes y más de 27 millones de jornales. Esto significa que representa más del 8 % del PBI Agrícola, mayor que cualquier otro cultivo alimenticio nacional y es cultivado por más de 600,000 familias. En 2003, con la elaboración del Plan Estratégico de la Cadena, se puso énfasis en la necesidad de incrementar el consumo de papa fresca y derivados promocionando su valor nutritivo y cualidades culinarias para revertir la reducción del consumo de papa que se produjo en la década de los noventa¹².

2.2.3. Factores que influyen en la diversidad y estructura genética

La diversidad y estructura genética están influenciadas por varios factores (Figura 2), siendo los principales la deriva génica, flujo genético, la reducción poblacional, la selección natural y artificial, y los métodos de reproducción. (Freeland, 2005 citado por Ponce 2013)²⁵.

La diversidad biológica puede dividirse en categorías que describen diferentes aspectos de los sistemas vivos, que los científicos miden de diferentes maneras. Hoy en día resulta ser una práctica común definir la diversidad biológica en función de los genes (diversidad dentro de una población o diversidad genética), las especies y los ecosistemas, los cuales corresponden a tres niveles fundamentales de la organización biológica y están jerárquicamente relacionados. La “diversidad genética” se refiere a la variación de los genes dentro de la especie; es decir, a la mezcla de genes contenidos dentro de los individuos. Esto abarca poblaciones diferenciadas de la misma especie o la variación genética dentro de una población. En último término, la diversidad genética radica en los cambios en la secuencia de los cuatro pares de bases del ADN que conforman el código genético. Las mutaciones de genes y cromosomas generan nueva variación genética, la cual se propaga por recombinación en los microorganismos cuya reproducción es sexual. Otros tipos de diversidad genética pueden ser causados por la cantidad de ADN por célula, o por variantes en la estructura y el número de cromosomas¹²¹.

La selección actúa en el acervo de variación genética actual y, en consecuencia, facilita la evolución y el mejoramiento selectivo artificial. La diversidad genética hace posible que las poblaciones se adapten a condiciones cambiantes del medio ambiente. Por lo general, el nivel de especie se considera como el nivel más natural para considerar la diversidad de todo el organismo. Las especies también son el foco primario de la evolución, el origen y la extinción de especies son los principales agentes de la diversidad biológica en casi todos los sentidos. La diversidad a nivel de especie puede medirse de diversas maneras. La ‘riqueza de especies’ es el número de especies en una región. La ‘diversidad taxonómica’ también mide la relación de las especies entre sí. La definición y clasificación de los ecosistemas son inexactas, porque sus

límites son imprecisos. Por tanto, en la práctica, es difícil evaluar la diversidad de los ecosistemas a otro nivel que no sea local o regional y luego sobre todo en función de la vegetación. Los ecosistemas son diferentes de los genes y las especies no sólo por su composición (incluyen componentes abióticos y están determinados, en parte, por los suelos y el clima), sino también por su estructura y función¹²¹.

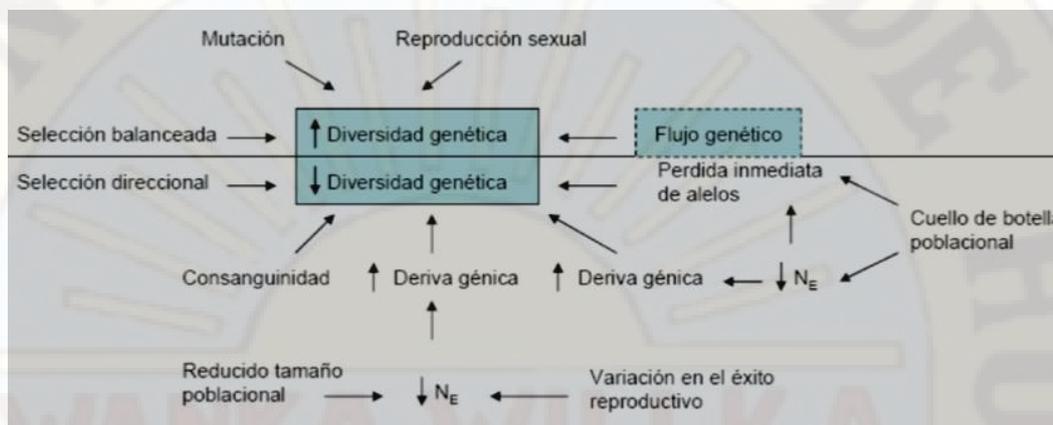


Figura 2. Principales factores que influyen en los niveles de diversidad genética dentro de una población. N_E es el número de la población efectiva (Adaptado de Freeland, 2005)²⁵.

Se encuentran diferencias genéticas entre individuos dentro de una población, y también en las frecuencias alélicas entre poblaciones. En total, la cantidad relativa de variación depende de la especie, la historia y el medio ambiente. La presencia de variantes (polimorfismo) en una muestra puede ser evaluada en función de sus genotipos, alelos, haplotipos o nucleótidos. Las muestras pueden dividirse jerárquicamente a nivel de especie, población o dentro de la población. El tamaño del muestreo debe ser suficiente cuando la meta es estudiar la variación genética. Las estrategias de muestreo y el tamaño de las muestras pueden depender de la organización de las especies¹²¹:

- Pocos individuos (una especie recién introducida).
- Numerosos individuos introducidos
- Individuos de diferente origen geográfico

2.2.4. Mejoramiento genético de *Solanum tuberosum* “papa”.

Las estrategias de recolección de germoplasma se fundamentan en las posibilidades de sistematizar el proceso y de darle continuidad. Hasta ahora los esfuerzos más sistemáticos se han basado en hechos prácticos. Los colectores individuales han decidido, desde el inicio del trabajo, cubrir poco a poco el territorio donde se distribuye el género de interés y continuar siempre y cuando los recursos estuvieran disponibles. Las

colecciones que se hacen en esa forma son generalmente incompletas. Las colecciones no son muestras representativas de la diversidad de la especie; se colectan muchos duplicados en el caso de plantas autógamas o de reproducción vegetativa. El número de colecciones dentro de una región, el tamaño de la muestra, el intervalo de colección y la recolección de datos de colección se realizan dependiendo de la personalidad y acuciosidad del colector. Para evitar esa situación, las colecciones se deben programar con anticipación, siendo conveniente que participen en el planeamiento todos los colectores. Es casi imposible tener un conocimiento preciso de la estructura genética de la población, pero el colector puede estimarla si conoce la forma de reproducción de la especie, o sea si es autógama, alógama, o de reproducción asexual⁴³.

El mejoramiento genético se realiza con el objetivo de generar cultivares de papa que satisfagan la demanda de los agricultores, comerciantes, industriales y consumidores en general y que tengan atributos de precocidad, mayor rendimiento, calidad culinaria y con resistencia a los principales factores bióticos y abióticos que afectan a la papa que causa pérdidas en el rendimiento y calidad del producto. El problema debe ser lo suficientemente grande para justificar la intervención del programa de mejoramiento genético y la solución del problema debe ser juzgada como asequible. El programa dispone de una amplia variabilidad genética para acceder a los genes valiosos de las papas silvestres y cultivadas emparentadas, contar con la infraestructura apropiada, los métodos apropiados y disponibilidad de un buen respaldo económico a mediano y largo plazo⁵⁴.

El mejoramiento tradicional de especies consiste en el cruzamiento de plantas que muestran alguna característica novedosa. Sin embargo, para alcanzar la manifestación de una nueva característica deseable se hace necesario la selección de aquellas plantas recombinantes que logran adquirirla. Este proceso puede necesitar hasta 10 generaciones de selección de las plantas mejoradas y el descarte de aquellas en donde la característica no se logra expresar completamente. Con los avances de la biología molecular se ha logrado ubicar e incorporar solamente el gen o los genes que tienen esta característica novedosa y se ahorra mucho tiempo en la obtención de variedades mejoradas. Igualmente, se asegura que el mejoramiento inducido sea más puntual y directo, ya que existen técnicas que permiten corroborar la presencia o ausencia del gen en plántulas jóvenes, lo cual a su vez agiliza notablemente los procesos de selección de los individuos agrónomicamente interesantes. La utilización eficiente de los recursos fitogenéticos depende de su adecuada caracterización. Tradicionalmente, estas caracterizaciones se han realizado utilizando largas listas de descriptores fenotípicos, principalmente de tipo morfológico o agronómico. Esto ha permitido

diferenciar algunos materiales, pero a veces en forma imprecisa, debido a la interacción de estas variables con las condiciones ambientales⁵⁵.

La Fundación PROINPA ha generado a través de 20 años una estrategia donde se describe de manera detallada el proceso de mejoramiento genético de la papa, que ha permitido obtener por selección recurrente de nuevos cultivares, los cuales están siendo utilizados en varias zonas de Bolivia. Se desarrolló una metodología de Fitomejoramiento Participativo (FMP), que contribuyó a la consolidación del programa de mejoramiento genético de papa en Bolivia. Esta es una metodología novedosa que involucra un diálogo de saberes entre agricultores y fitomejoradores para obtener nuevos cultivares mejorados de papa. También se ha iniciado la selección asistida por marcadores moleculares a través del uso de marcadores microsatélites y genes candidato. Se espera que en un futuro cercano estas técnicas modernas de la biología molecular sean de rutina y ayuden a una selección más rápida y segura de los nuevos cultivares y progenitores. En este proceso se ha involucrado la participación de diferentes especialistas en fitopatología, nematología, biología molecular, recursos genéticos, agroindustria, socioeconomía y otros de PROINPA. Contó con el apoyo de aliados externos como el Centro Internacional de la Papa (CIP), el Instituto Colombiano Agropecuario (ICA), el Programa de Resistencia Duradera de la Zona Andina (PREDUZA), el Instituto Neiker Tecnalia del país Vasco-España, los INIAs de Chile, Argentina, Uruguay, Ecuador, Perú y otros⁵⁴.

Los marcadores moleculares presentan muchas ventajas en comparación con los marcadores genéticos de tipo morfológico, especialmente por su alto número y su independencia de los efectos del medio ambiente. Los marcadores permiten revelar las diferencias que existen entre los genomas como producto del proceso evolutivo. Como aplicaciones de estas técnicas se puede mencionar la definición de grupos genéticos a nivel intra-específico (entre la misma especie) y la organización filogenética de las especies, o sea, las relaciones evolutivas entre distintas especies⁵⁶.

Si bien la papa se cultiva en todos los pisos ecológicos, alcanza su máximo crecimiento y desarrollo entre los 10 y 15 grados Celsius, es decir, en zonas frías y en altitudes que van de los 2000 a los 4000 metros sobre el nivel del mar. Por su origen, las variedades de papa se pueden clasificar en nativas y modernas. Las primeras tienen una antigüedad de cerca de 5000 años y, desde épocas ancestrales, solo se cultivan en las comunidades campesinas ubicadas entre los 3000 y 4200 metros de altura. Las variedades nativas más conocidas son la Huagalina, Huayro, Huamantanga, Peruanita, Amarilla Tumbay, Wira Pashña y Ccompis. Las otras, las modernas, no tienen más de 55 años de antigüedad y son conocidas como mejoradas o blancas. Muchas de ellas fueron trabajadas

por el doctor Carlos Ochoa, como la Yungay y la Tomasa Condemayta. Pero también están la Perricholi, la Liberteña y la Serranita⁵⁷.

La papa *Solanum tuberosum* es una planta dicotiledónea tetraploide con número haploide 12 ($4x = 48$). Su genoma tiene unos 850 Mb (Megabases igual a millones de pares de bases nucleotídicas). La papa es miembro de la familia Solanácea, que contiene más de 3000 especies, las que incluyen cultivos de importancia económica como el tomate, el tabaco y la pimienta. Existen algunos “cuellos de botella” que limitan la eficiencia del mejoramiento genético de la papa^{39, 58, 59}.

- Los más importantes cultivares de papa son tetraploides con herencia tetrasómica; así la segregación es más complicada que con herencia disómica, y la selección incluso para caracteres de herencia simples algunas veces laborioso y se observa menos eficiencia de costos comparado con los diploides.
- Los mayores objetivos de mejoramiento tienden a ser de herencia cuantitativa, por ejemplo, resistencia a enfermedades bacterianas causadas por *Pseudomonas solanacearum*, enrollamiento foliar viral, polilla de la papa y nematodo del nudo de la raíz, tanto como calidad de tubérculo y componentes de rendimiento.
- La interacción genotipo-ambiente complica la expresión de los caracteres.
- La identificación de cromosoma individual por métodos convencionales es muy difícil, y esto hace muy complicado monitorear introgresiones hibridaciones a partir de especies silvestres, los cuales son fuentes valiosas de resistencia a las importantes enfermedades y pestes.

Los marcadores de ADN requerirían un máximo de algunos días para identificar el genotipo de interés, una pequeña cantidad de tejido vegetal será suficiente. La reducción de costos puede darse por la simplificación de muchos procedimientos en la utilización de los marcadores ADN. Preparación de muestras en etapas tempranas pueden ser simplificadas. El empleo de marcadores basados en PCR puede facilitar los procesos de selección e incrementar la eficiencia de la labor, costos y tiempo^{33, 39, 60}.

Localización de genes de importancia económica ya han sido demostrados con algunos loci de herencia simple los cuales confieren resistencia a enfermedades y peste. Por ejemplo, el locus R1, que controla la resistencia al tizón tardío está sobre el cromosoma 5, fue mapeado usando dos poblaciones. Los marcadores de ADN pueden ayudar a resolver el complejo control de caracteres cuantitativos identificando los genes involucrados y sus interacciones con el medio ambiente, algunas resistencias a enfermedades y pestes que tienen herencia cuantitativa son objeto de mapeo con marcadores de ADN, tales

como tricomas glandulares que confieren resistencia en el follaje y múltiple resistencia al nematodo quiste de la papa^{59, 61}.

2.2.5. Posición Taxonómica de la Papa

La taxonomía de la papa según Hawkes¹⁰, Hawkes⁴⁸ y Ochoa⁶².

Reino	: Plantae
División	: Magnoliophyta
Clase	: Magnoliopsida
Subclase	: Asteridae
Orden	: Solanales
Familia	: Solanaceae
Género	: Solanum
Espciece	: <i>Solanum</i> spp.

La taxonomía ha sido ampliamente estudiada durante los últimos años, sin embargo, existe una gran controversia acerca de la clasificación de los diferentes grupos cultivados de papa dentro de una sola especie.

2.2.6. El DNA o ADN

Los ácidos nucleicos constituyen el material genético de los organismos y son necesarios para el almacenamiento y la expresión de la información genética. Existen dos tipos de ácidos nucleicos química y estructuralmente distintos: el ácido desoxirribonucleico (ADN) y el ácido ribonucleico (ARN); ambos se encuentran en todas las células procariotas y eucariotas. El ADN funciona como el almacén de la información genética y se localiza en los cromosomas del núcleo, las mitocondrias y los cloroplastos de las células eucariotas. En las células procariotas el ADN se encuentra en su único cromosoma y, de manera extracromosómica, en forma de plásmidos. El ARN interviene en la transferencia de la información contenida en el ADN hacia los compartimientos celulares. Se encuentra en el núcleo, el citoplasma, la matriz mitocondrial y el estroma de cloroplastos de células eucariotas y en el citosol de células procariotas^{63, 64}.

La molécula de DNA es un polímero que se forma por enlace covalente de miles de desoxinucleótidos. El desoxinucleótido, o unidad estructural del DNA, contiene un ácido fosfórico, un azúcar de 5 átomos de carbono o pentosa y una base nitrogenada. El DNA contiene 4 bases nitrogenadas: adenina (A) y guanina (G), que derivan de la purina, y citosina (C) y timina (T), que derivan de la pirimidina. El enlace de la pentosa (que en el caso del DNA es una desoxirribosa) y una base nitrogenada forma una molécula denominada deoxinucleósido. La unión de un ácido fosfórico a esta molécula forma el desoxinucleótido. Los desoxinucleótidos se unen para formar el polímero lineal, o polidesoxinucleótido, en el cual el grupo fosfato en posición 5' de la desoxirribosa se une por un enlace éster con

el hidroxilo 3' de la desoxirribosa del desoxinucleótido vecino, y así sucesivamente. El polímero forma una hebra donde se alternan una desoxirribosa y un fosfato, mientras que las bases se unen perpendicularmente a ésta^{65, 66}.

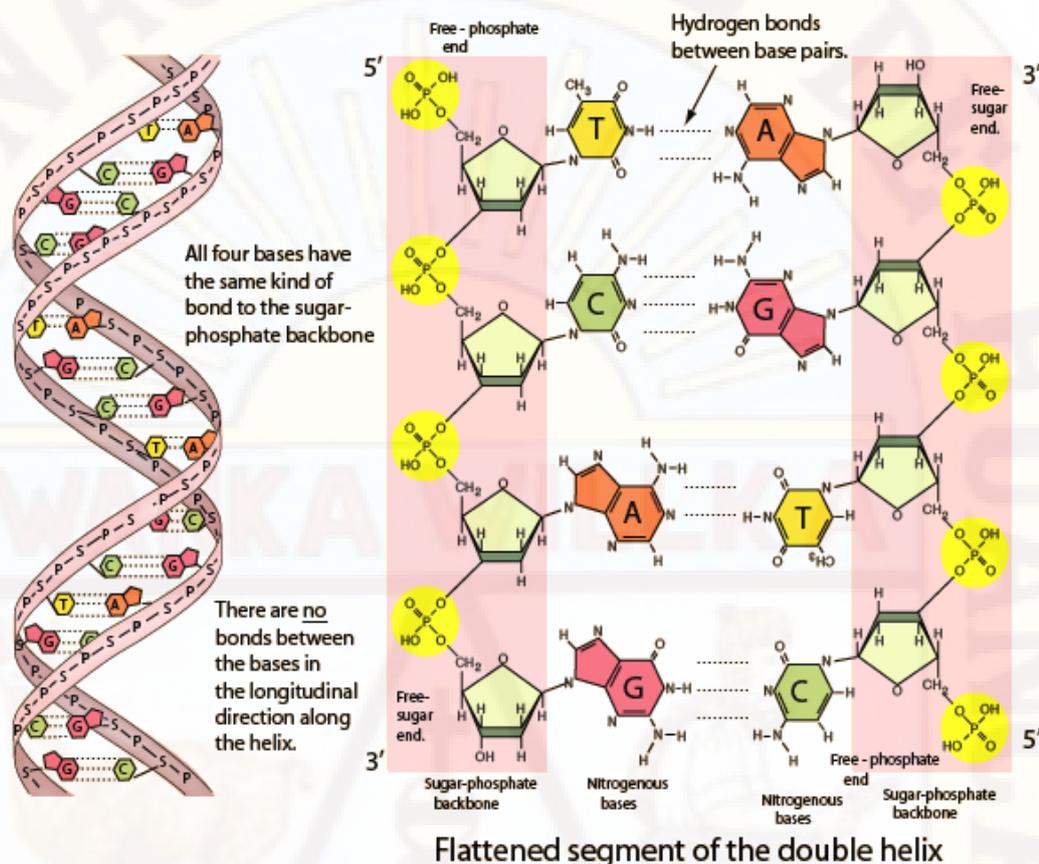


Figura 3. Segmento aplanado de la doble hélice de ADN

La estructura secundaria del DNA propuesta por Watson y Crick es una hélice de giro a la derecha formada por dos hebras de polidesoxinucleótidos orientadas en sentido antiparalelo; es decir, el extremo 5' de una hebra queda frente al extremo 3' de la otra. Esto significa que, en uno de los extremos de la molécula de DNA, una hebra tiene el ácido fosfórico que se une al carbono 5' de la desoxirribosa libre y en el otro extremo contiene la desoxirribosa con el -OH 3' libre; la otra hebra tiene, frente al ácido fosfórico 5', la desoxirribosa con el -OH 3' libre y frente a la desoxirribosa con el -OH libre, un ácido fosfórico 5'. Las dos hebras se unen por puentes de hidrógeno que se establecen de manera específica o complementaria entre las bases de las dos hebras. Una molécula de adenina se une, por dos puentes de hidrógeno, a una de timina; y una de guanina se une por tres puentes de hidrógeno a una de citosina. En la parte exterior de la hélice, se alternan moléculas de desoxirribosa y fosfato, mientras que las bases se proyectan perpendicularmente hacia el interior⁶⁵.

En el DNA de las células de un organismo se encuentra toda la información genética que lo define. Un gen, es decir, una unidad de información genética, contiene la información para la síntesis de una molécula de RNA que es complementaria a una de las dos hebras del DNA. Los principales RNA celulares son el RNA ribosomal (rRNA), el RNA de transferencia (tRNA) y el RNA mensajero (mRNA). Cada molécula de mRNA contiene la información para la secuencia de aminoácidos de una proteína, mientras que las moléculas de rRNA y de tRNA forman parte de la maquinaria celular que traduce la información de los mRNA a proteínas. En resumen, la información para las moléculas de RNA y para las proteínas presentes en una célula está codificada en el DNA de ese organismo. La información para la secuencia de aminoácidos de una proteína está codificada en el mRNA, en unidades independientes de tres bases llamadas codones. La combinación de cuatro letras, A, T, C y G en el DNA, o A, U, C y G en el mRNA, en unidades de tres, puede generar 64 codones (4^3). Los 64 codones y el significado de cada uno constituyen el código genético. Una proteína está formada por la combinación de alrededor de 20 aminoácidos diferentes, por lo que varios codones pueden codificar para un mismo aminoácido. Por ejemplo, el aminoácido leucina (Leu) está codificado por los codones UUA, UUG, CUU, CUC, CUA, y CUG. Esta propiedad se denomina “degeneración” del código genético. Tres de los 64 codones no codifican para un aminoácido, sino que funcionan como señal de terminación en la síntesis de proteínas^{65, 66}.

La primera etapa de todo estudio de biología molecular es la extracción del ADN genómico total en una especie, de tal manera que se puede estudiar al nivel genotípico y luego comprender mejor el fenotipo⁶⁶, permitiendo tener criterios genéticos para conservar la variabilidad genética y orientar el mejoramiento genético de las plantas. Por ello es muy importante conocer los aspectos más relevantes del ácido desoxirribonucleico (ADN) que se puede resumir en:

- El ADN está compuesto de nucleótidos formando una hebra de doble cadena, las que están unidas a su complemento por medio de puentes hidrógeno y fuerzas de van der Waals.
- Los nucleótidos están unidos por enlaces fosfodiéster y contienen la pentosa 2'-desoxirribosa y una de las bases nitrogenadas: adenina, guanina, citosina o timina.
- Se solubiliza en soluciones acuosas a pH 7.8.
- Se comporta químicamente como un polisacárido levemente ácido.
- Se desnaturaliza con calor a 94°C, luz UV a 260 nm, o en soluciones alcalinas a neutras: NaOH, urea, formamida.

La técnica utilizada para la colecta y preservación del tejido vegetal es muy importante que influya en la calidad de ADN extraído. La cantidad y la calidad de ADN son afectadas en general por la condición del tejido antes de la extracción. Esto es particularmente importante en las especies que producen grandes cantidades de metabolitos secundarios que en general interfieren con la extracción exitosa del ADN. Por otro lado es mejor utilizar material fresco, recogido en la fase de crecimiento^{24, 67}.

2.2.7. Protocolos de Extracción de ADN

El primer paso para desarrollar experimentos con marcadores moleculares es la extracción del material genético de plantas que, por sus características fenotípicas, poseen caracteres agronómicos de interés. Para la extracción del ADN vegetal es necesario tener en cuenta tres factores⁶⁸:

1. El tipo de planta y de tejido que se va a emplear como fuente. Por ejemplo, los tejidos jóvenes contienen más ADN que los tejidos viejos. Además, es necesario considerar la composición bioquímica de los tejidos. Por ejemplo, el método de extracción del material genético proveniente de tejidos ricos en compuestos fenólicos es diferente al método empleado con tejidos ricos en carbohidratos o aceites.
2. El tipo de ADN que se va a extraer. Las plantas poseen tres tipos de ADN: el nuclear, el mitocondrial y el cloroplástico. Reciben estos nombres dependiendo del tipo de organelo celular en el que el ADN se encuentre. Los distintos tipos de ADN tienen características bioquímicas semejantes. Sin embargo, el tipo de información biológica que codifican es completamente diferente.
3. El tipo de análisis a realizar (RFLP, RAPD, AFLP, SSR, etc.). Con base en la cantidad y la calidad del ADN se pueden desarrollar diversas técnicas de análisis. El objetivo principal en un experimento de extracción de ADN es obtener una preparación de buena calidad y en gran cantidad. La calidad se refiere a la posibilidad de almacenar el ADN por tiempo indefinido, manteniendo su estructura y propiedades y es la calidad del ADN el factor responsable de la reproducibilidad en experimentos posteriores. La cantidad, por su parte, es un concepto relativo que depende, entre otros, del número y estado de las células propias del tejido a estudiar. Por lo tanto, como regla general, un buen método de extracción debe mantener la integridad física y bioquímica del ADN e incrementar sus rangos de pureza y concentración.

En plantas existen múltiples protocolos para extraer y purificar el ADN. Sin embargo, todos ellos incluyen cuatro pasos indispensables⁶⁹:

1. Ruptura de tejidos y paredes celulares. Este paso consiste en pulverizar el material vegetal a bajas temperaturas, generalmente

empleando nitrógeno líquido o hielo seco. También existe la pulverización en seco, un proceso en el cual los tejidos se deshidratan por secado en un horno o con silicagel. Para degradar paredes celulares se pueden utilizar, además, enzimas tipo celulasas.

2. Ruptura de membranas. Una vez el tejido es disgregado en células, se hace necesario romper las membranas celulares para liberar el ADN. Esto puede ser llevado a cabo químicamente con detergentes (SDS, Triton o detergentes comerciales). También se emplean métodos físicos, como aquellos basados en ultrasonido.

3. Inhibición de enzimas que destruyen al ADN. Como un mecanismo de defensa natural, las células contienen enzimas que destruyen al ADN (ADNasas). Estas enzimas deben ser inactivadas para garantizar la calidad de las preparaciones de ADN. La inhibición puede realizarse mediante métodos físicos, tales como desnaturalización por calor (a temperaturas de 65°C) o con métodos químicos. Estos últimos incluyen tratamiento con solventes orgánicos (fenol y cloroformo), con antioxidantes (Dithiothreitol y β -mercaptoetanol), con agentes quelantes (EDTA, EGTA) que capturan los iones magnesio necesarios para la funcionalidad de las ADNasas, o con agentes caotrópicos que actúan removiendo el agua estructural de las proteínas. Por lo general se utilizan mezclas de varios de estos reactivos para asegurar la inhibición de tales enzimas.

4. Extracción de contaminantes. El objetivo de extraer ADN es obtener preparaciones enriquecidas en esta molécula. Sin embargo, el ADN está asociado con proteínas (histonas) e inmerso en un medio que contiene estructuras de composición química diversa. Además, los reactivos empleados en los procesos iniciales de purificación se convierten en agentes contaminantes. Las metodologías para retirar los contaminantes de una preparación de ADN incluyen: la centrifugación a altas velocidades, la electroforesis, la separación a través de columnas e incluso la utilización de imanes (biomagnética) para obtener preparaciones de alta pureza. Un contaminante generalmente presente en preparaciones de ADN es el ARN (ácido ribonucleico). Esta molécula se degrada por incubación con la enzima ARNasa.

Todos los pasos anteriormente mencionados se basan en las características fisicoquímicas del ADN. Pues aparte de ser una molécula de alto peso molecular, muy larga y delicada, es un ácido capaz de formar sales con iones cargados positivamente (cationes). Además, es soluble en soluciones concentradas de sales, pero insoluble en alcoholes (tipo etanol o isopropanol). Adicionalmente, el ADN es destruido (depurinado) a pH ácido (menor de 4,0), es insoluble a pH 5.6, pero es soluble a pH 8,0. Por lo tanto, los procesos de extracción, purificación y almacenamiento

del ADN deben mantener el pH óptimo y brindar una alta concentración iónica. Dicho protocolo es una variación de la metodología propuesta por Dellaporta^{70, 71}.

Muchos protocolos para la extracción de ADN de plantas reportan el uso de CTAB (cationic hexadecyl trimethyl ammonium bromide) en la solución buffer de extracción. Este protocolo es muy utilizado en las especies vegetales particularmente para extracciones a partir de pequeñas muestras de tejido. No existe un protocolo único, los métodos utilizados presentan modificaciones con el objeto de resolver problemas específicos de cada especie vegetal²⁴.

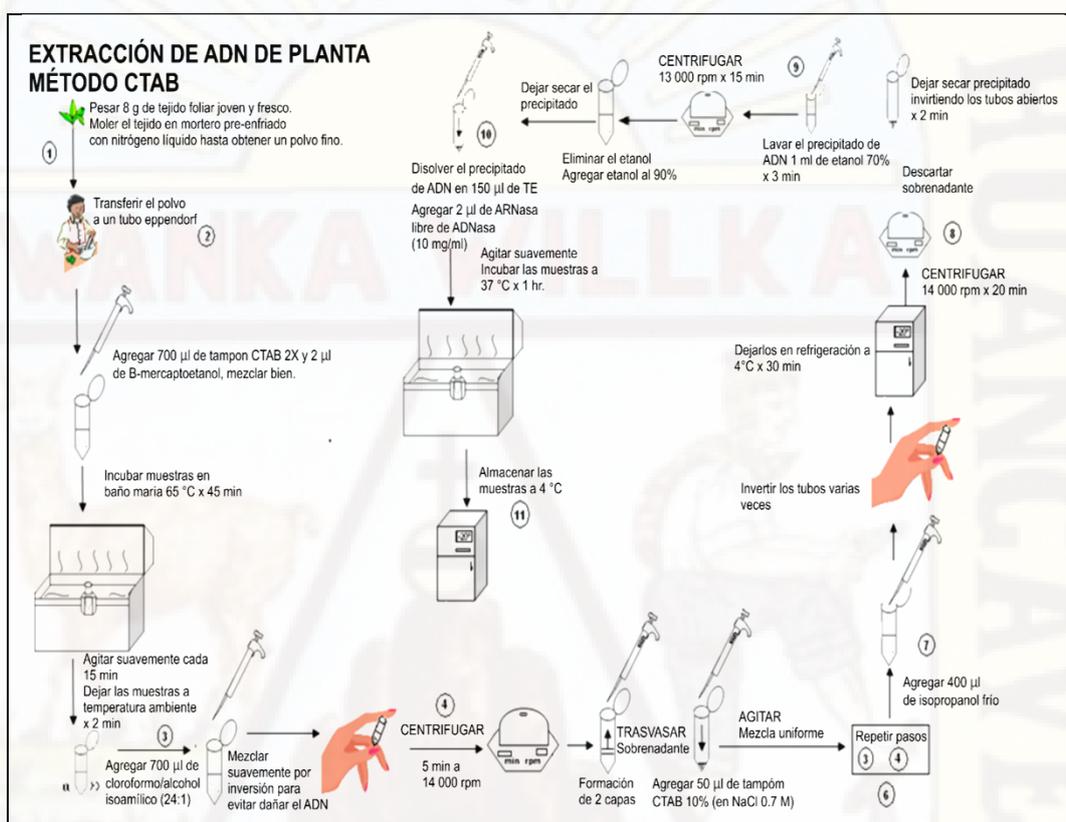


Figura 4: Modelo de extracción de ADN método CTAB⁷¹.

El método Dellaporta⁷⁰ y Doyle y Doyle⁷¹, se adaptaron para la extracción de ADN en una gran cantidad de especies incluyendo especies cuyos tejidos son difíciles. La calidad de ADN obtenido por este método es suficientemente aceptable y viable para la amplificación de PCR. El medio de extracción se basa en acetato de sodio 3 M y ajustado a un pH de 5.2. El pH utilizado en el buffer de extracción debe ser seleccionado para evitar la acción de las enzimas degradativas del ADN. Señala que la mayoría de las enzimas lipolíticas y lipoxigenasas tienen pH óptimo entre 5.0 y 6.0, mientras que las ADNasas tienen pH óptimo próximo a 7.0.

Los problemas en el aislamiento del ADN, específicamente de plantas, son la presencia de actividades de enzimas nucleasas tales como ADNasa y de otras macromoléculas que son aisladas simultáneamente

durante el proceso de purificación. El problema de nucleasas se reduce mediante la remoción de cationes tales como el Magnesio, que es necesario para la actividad de las mismas. Agentes como el EDTA, EGTA y fenantrolina, se han usado en diferentes protocolos y a diversas concentraciones en función de las especies de plantas. Los investigadores en plantas encuentran macromoléculas no deseables asociados al ADN, que crean dificultades en las técnicas de aislamiento. Un reactivo utilizado en varios procedimientos es el bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB), el cual se pega fuertemente el ADN, desplaza las proteínas y previene la degradación. EL CTAB se remueve mediante la extracción con cloroformo y el ADN permanece en fase acuosa y lista para ser precipitado con etanol^{71, 72}.

El grado de degradación del ADN puede ser estimado por la electroforesis de una alícuota de la muestra en geles de agarosa. El ADN de peso molecular alto aparece como banda definida en la parte superior del gel a poca distancia de los pozos, mientras que el material parcialmente degradado, forma un barrido (Parecido a una mancha) de fragmentos pequeños a lo largo del carril haciendo que la definición de la banda citada pierda su nitidez o no se aparece. Algunas veces el ADN puede estar contaminado con otras sustancias que también absorben la radiación UV, como por ejemplo los compuestos fenólicos y polisacáridos principalmente. La presencia de estos compuestos, puede evitar la interpretación correcta de la calidad e incluso la cantidad de ADN que está siendo analizada. Una forma rápida de estimar la pureza de estas moléculas, es a través de la fluorescencia que emite el bromuro de etidio cuando está mezclado con ellas. Este compuesto tiene afinidad por molécula de ADN de manera que al irradiar el gel con una fuente de luz UV se parecía la ubicación, calidad y cantidad de la molécula en cuestión⁷².

2.2.8. Marcadores genéticos y marcadores moleculares

Los marcadores genéticos representan las diferencias entre organismos individuales o especies. Generalmente ellos no representan los genes objetivo en sí mismos pero actúan como señales o etiquetas ya que son secuencias específicas⁷³.

Un marcador genético es una secuencia de ADN con un componente variable que permite identificar diferencias entre individuos y que puede ser localizado en una posición concreta del genoma. Al componente variable de los marcadores genéticos se le denomina polimorfismo. A cada una de las variantes de un marcador genético se le llama alelo. Cuando un individuo tiene dos alelos iguales se dice que es homocigoto para ese marcador genético y cuando tiene dos alelos diferentes se dice que es heterocigoto^{20, 110}.

El concepto de los marcadores genéticos no es nuevo, Gregorio Mendel empleó marcadores genéticos basados en fenotipo para sus experimentos con guisantes en el siglo XIX. Los primeros marcadores utilizados en estudios genéticos fueron los marcadores morfológicos, los cuales eran representaciones de caracteres de fácil identificación visual. Estos marcadores contribuyeron significativamente en el desarrollo teórico del análisis de ligamiento génico y sirvieron para la construcción de las primeras versiones de mapas genéticos. Sin embargo, estos caracteres pueden ser enmascarados por efectos epistáticos o pleiotrópicos, interactuando los alelos (variantes del gen) de manera dominante o recesiva dificultando la diferencia entre un individuo homocigoto de un individuo heterocigoto, por tanto el uso de estos marcadores se consideró limitado²⁴.

Los marcadores moleculares corresponden a regiones del ADN que muestran polimorfismo o variación entre diferentes individuos dentro de una especie. El análisis de ADN presenta múltiples ventajas, por entregar información genética precisa, permitir el análisis simultáneo de un gran número de muestras y es independiente del medio ambiente. Por otro lado, el ADN puede ser extraído a partir de cantidades ínfimas de tejido de cualquier órgano somático y estado de desarrollo de la planta, permitiendo la obtención de resultados en un corto plazo^{26, 63}.

Se han descrito diversos tipos de marcadores de ADN útiles para la identificación de genotipos y cultivares de papa tales como RFLP, AFLP, RAPD y SSR. Sin embargo, los más utilizados y aceptados han sido los SSRs (Single Sequence Repeat) o microsatélites. Los SSRs presentan mayor simplicidad tecnológica en relación a RFLP y AFLP, y no requieren alta concentración y calidad de ADN. Por otro lado, los SSRs al contrario de los marcadores RAPD, presentan alta reproducibilidad entre laboratorios y son de base genética codominante, y generalmente permiten detectar todos los alelos posibles de un *locus*^{6,74,75,76}. Mediante los marcadores moleculares se puede reconocer directamente las diferencias genéticas entre individuos, obteniéndose un “perfil molecular” o “fingerprinting” o “huella digital” característico para cada variedad e independiente de las condiciones de crecimiento de las plantas. Además permiten obtener mejores estimaciones de la diversidad genética de una población determinada, así como información sobre frecuencias alélicas, nivel de heterocigosidad de una población y subdivisión de poblaciones, entre otras, en un periodo de tiempo menor al ocupado mediante estrategias convencionales.

En el área de los recursos genéticos los marcadores han provisto de información relevante en áreas claves de la conservación y caracterización de germoplasma. Las principales ventajas de los marcadores moleculares son: facilitar la construcción de mapas genéticos

debido al alto nivel de polimorfismo, en su mayoría son codominantes (dominantes o recesivos) y contienen mayor información genética por locus que los marcadores morfológicos, pueden utilizarse en cualquier fase de desarrollo de la planta, y son neutros con relación a los efectos fenotípicos causados por epistasia (interacción entre los genes que actúan sobre el mismo carácter, en donde un gen enmascara o suprime el efecto del otro)⁷⁸.

Los marcadores del ADN se basan fundamentalmente en el análisis de las diferencias en pequeñas secuencias del ADN entre individuos. Las técnicas empleadas para ello son muy diversas y dan el nombre a los distintos tipos de marcadores, los cuales pueden ser de carácter dominante o codominante. Algunos ejemplos de ellos son: Polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP), Amplificación aleatoria del ADN polimórfico (RAPD), Polimorfismo en la longitud de los fragmentos amplificados (AFLP), Microsatélites o Secuencias simples repetidas (SSR), Amplificación aleatoria del polimorfismo de microsatélites⁷⁸.

Se han desarrollado muchos sistemas de marcadores genéticos, los que se han agrupado generalmente en tres tipos: 1) marcadores morfológicos, que usualmente son características fenotípicas visibles; 2) marcadores bioquímicos, llamados isoenzimas o aloenzimas, que son polimorfismos en ciertos tipos de enzimas; 3) marcadores moleculares (o de ADN), son marcadores que revelan sitios de variación en el ADN^{24, 29}.

La principal desventaja radica en el elevado costo dado que se requieren equipos de laboratorio complejos y reactivos costosos. Los principales marcadores moleculares son los siguientes: RFLP (Restriction Fragments length polymorphism), RAPD (Random Amplified Polimorphic DNA), AFLP (Amplified Fragment length polymorphism), SCAR (Sequence Characterised Amplified Region), SST (Sequence Tagged Sites), microsatélites: STMS (Sequence Tagged Microsatellite Sites) y SSR (Short sequence Repeats)¹¹¹.

Los marcadores de ADN revelan diferencias entre individuos de la misma especie o de diferentes especies; estos marcadores son llamados polimórficos, mientras que aquellos que no discriminan entre genotipos se denominan monomórficos. Los marcadores polimórficos pueden ser codominantes o dominantes. Los marcadores codominantes son aquellos que discriminan los homocigotos y heterocigotos mientras que los dominantes no discriminan¹¹². Los marcadores de ADN, y en especial los microsatélites, están rápidamente reemplazando o complementando a otros marcadores o metodologías genéticas en las aplicaciones evolutivas y la conservación de las especies. Dado su elevado nivel de polimorfismo, resultan útiles para definir un único genotipo multilocus, de particular

interés en estudios donde se requiera una escala muy fina de resolución y en los cuáles otros tipos de marcadores podrían presentar algunas limitaciones. Un buen marcador molecular debe reunir una serie de características para maximizar su utilidad, entre ellas, debe tener una buena distribución a lo largo del genoma y alto grado de polimorfismo. La técnica para analizar el marcador debe ser rápida, práctica y debe repetirse con fiabilidad en otros laboratorios¹³⁴.

2.2.9. Los marcadores microsatélites o SSR

Los microsatélites se encuentran ampliamente distribuidos en los genomas de organismos eucariotas, y a nivel molecular corresponden a secuencias de 1 a 5 nucleótidos repetidas en tándem, en donde el número de repeticiones revela diferencias genéticas entre individuos. En general, el grado de polimorfismo revelado aumenta con la longitud total del SSR, y aunque un microsatélite no es específico de un *locus*, las regiones flanqueantes sí lo son, por lo que un par de primarios para estas regiones amplificará un microsatélite concreto^{26,79}.

Los microsatélites o SSRs son marcadores moleculares que han sido usados con éxito para varios propósitos desde el fitomejoramiento hasta la evaluación de poblaciones orientada a la conservación⁸⁰ en una multitud de especies vegetales, muchas de ellas de importancia comercial⁷⁹. El valor de los microsatélites reside en su condición altamente polimórfica, su naturaleza codominante, su abundancia dentro del genoma, su detección sencilla por PCR, cobertura extensa del genoma y su requerimiento de una pequeña cantidad de ADN para el análisis⁷⁹. El carácter hipervariable de los SSRs permite discriminar eficazmente entre individuos estrechamente relacionados, lo cual es de utilidad para la identificación de cultivares⁸¹.

Los microsatélites o secuencias simples repetidas (SSR) son regiones de secuencias pequeñas (dos a 10 pares de bases) repetidas, arregladas en serie, las cuales se asume que están distribuidas azarosamente por todo el ADN. Son secuencias de ADN altamente variables dispersas a través de los genomas de hongos, plantas y animales, los cuales pueden o no estar asociadas con genes, son loci altamente mutables que pueden estar presentes en muchos sitios del genoma. Dado que, la repetición por sí misma no codifica para formar ninguna proteína, y debido a que las secuencias de ADN repetitivo pueden recombinarse y expandirse más frecuentemente que otros tipos de secuencias, estas regiones son a menudo altamente variables y consecuentemente útiles para medir el polimorfismo entre especies o variedades muy relacionadas⁷⁸.

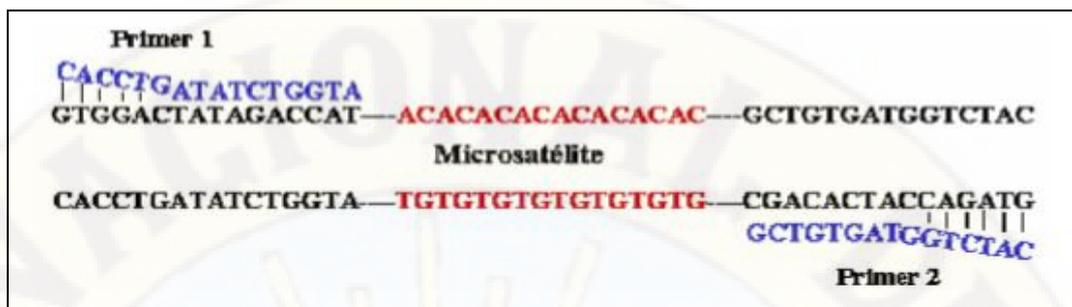


Figura 5. Microsatélites, ejemplo de un di-nucleótido A-C(n)

Fuente: Aranguren-Méndez et al., (2005)¹³⁴

Los tipos de repeticiones que ocurren en los SSR varían entre las especies. Las repeticiones más frecuentes en las plantas son (AA)n y (AT)n. Estas repeticiones están concentradas en secciones grandes del ADN que no codifican para genes conocidos y que se han llamado macrosatélites, por lo que probablemente no son útiles como aquellos marcadores que están distribuidos al azar. Las secuencias (GA)n y (GT)n y sus complementos (CT)n y (CA)n se presentan con más frecuencia y están aleatoriamente espaciadas en el genoma de maíz. También observaron que estos loci son altamente polimórficos entre variedades de arroz, por lo que son útiles como herramientas de mapeo y para estudios de polimorfismos intraespecíficos. Los SSRs representan un nivel adicional de información genómica que se puede usar para los estudios de mapeo y para la determinación de polimorfismos⁷⁸.

Una vez localizados tales secuencias cortas de ADN, que son frecuentes en el genoma, se secuencian las zonas que las flanquean y se construyen, a partir de estas, cebadores que debido a los extremos serán de secuencia única, y debido al fragmento repetido entre ellos, podrán aparearse a numerosos puntos del genoma, generando innumerables *loci*. Los *alelos* de un mismo locus son secuencias con distinto número de copias del motivo (GA, CAC, ATC, etc.) repetido; la combinación de numerosos *loci* con innumerables *alelos* hace que el total de microsatélites sea ilimitado. El número de polimorfismos a que dan lugar es muy elevado con ventajas sobre RAPD y AFLP: son codominantes, de alta reproducibilidad y dan lugar a puntos fijos de mapa. Son ideales para la identificación varietal¹¹¹. Los marcadores moleculares corresponden a regiones del ADN que muestran polimorfismo o variación entre diferentes individuos dentro de una especie. El análisis de ADN presenta múltiples ventajas, por entregar información genética precisa, permitir el análisis simultáneo de un gran número de muestras y es independiente del medio ambiente, además pueden ser utilizados en cualquier fase de desarrollo de la planta. Por otro lado, el ADN puede ser extraído a partir de cantidades ínfimas de tejido de cualquier órgano somático y estado de desarrollo de la planta, permitiendo la obtención de resultados en un corto plazo^{29, 66}. Los microsatélites o SSR, fueron reportados como un sistema

de marcadores en combinación con el PCR, por primera vez en 1989, se determinó que los microsatélites representan el 3% del genoma. Estos marcadores son iteraciones de un motivo nucleotídico de 1 a 6 bp (pares de bases). Las repeticiones mono-, di-, tri- y tetranucleotídicas son las más comunes, mientras que las repeticiones penta- y hexanucleotídicas son las de menor frecuencia. Posteriormente, búsquedas en bancos de datos de secuencias publicadas de ADN de plantas revelaron que los sitios de microsatélites están ampliamente distribuidos con una frecuencia de uno cada 50 mil pares de bases. Los marcadores SSR son usados como un efectivo método de tipificación genética gracias a su abundancia y distribución en el genoma, herencia codominante, elevada tasa de mutación, sumados a su alta reproducibilidad en comparación con otros marcadores moleculares, su fácil detección, por requerir procedimientos técnicos simples repetibles y su potencial para la automatización. Sus aplicaciones abarcan estudios de ADN ancestral y forense, genética de poblaciones y también de conservación y manejo de recursos biológicos, como es el caso de identificación de individuos, análisis de identidad genética, estudios de diversidad y estructura genética, ubicación de genes o complejos de genes deseables y la ubicación física de una secuencia de ADN de interés en el mapa cromosómico de una accesión determinada con fines de mejoramiento^{23, 28, 59, 107}.

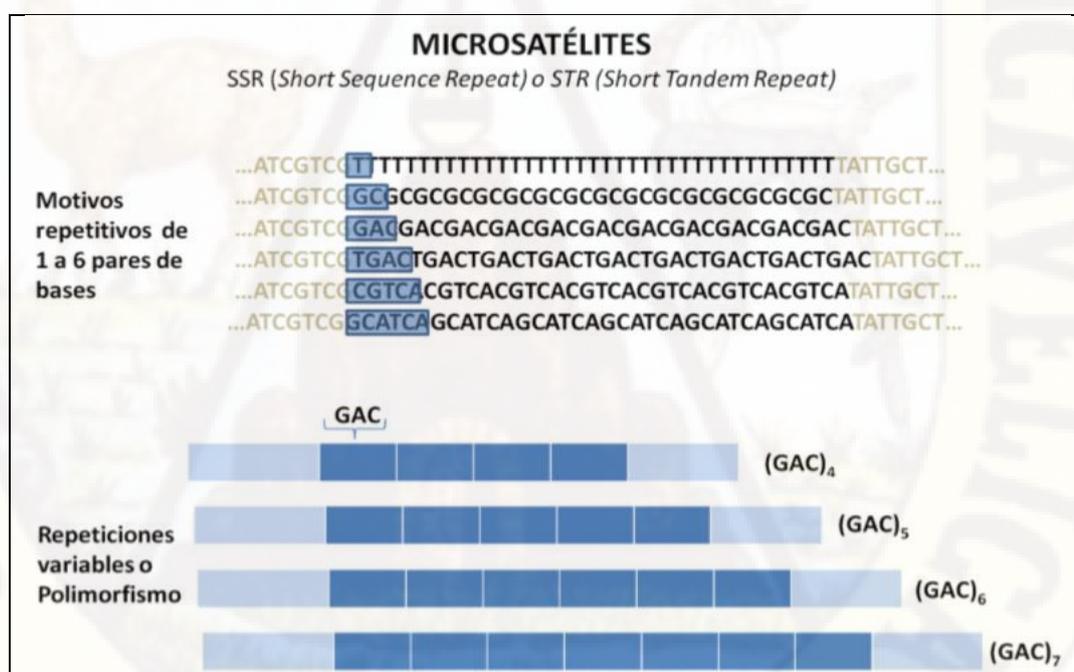


Figura 6. Motivos repetitivos y polimorfismo de los Microsatélites o SSR²⁵.
Fuente: Ponce et al., (2013)²⁵

El desarrollo de marcadores SSR es muy laborioso debido a que deben identificarse y secuenciarse regiones genómicas concretas (bordes del microsatélite), aunque una vez conseguido presenta un sistema muy informativo. Al respecto, Cervera et al. (2002)⁷⁴ mencionan que aunque

los microsatélites permiten analizar sólo un locus por experimento son bastante informativos ya que dejan diferenciar las variantes alélicas de los loci analizados y por lo tanto identificar grupos de ligamiento entre diferentes mapas genéticos. Sin embargo, para su desarrollo se precisa conocer la secuencia y, por lo tanto, son menos numerosos que otros marcadores dominantes. Estos marcadores son ideales para el estudio de ligamiento genético en plantas y el mapeo físico, los estudios poblacionales y la identificación de variedades⁷⁸.

Los análisis con marcadores genéticos del tipo microsatélite para el estudio de poblaciones resultan muy útiles y valiosos, ya que además de la evaluación de la variabilidad genética, la información generada permite estudiar con mayor exactitud la estructura genética y la caracterización molecular de las poblaciones y/o razas. Así mismo, los microsatélites pueden ser usados eficazmente para establecer las relaciones genéticas entre poblaciones y razas, de gran utilidad en la evaluación global de la diversidad (dentro y entre razas), que es sumamente útil y debería ser tomada en cuenta a la hora de tomar decisiones para poner en práctica planes de conservación y mejoramiento¹³⁴.

2.2.10. Usos de microsatélites en papa

Los marcadores microsatélites han sido usados en papa para estudios de diversidad, estructura genética, clasificación taxonómica, rastreo de migraciones de germoplasma, identificación, mapas de ligamiento genético, para establecer colecciones núcleo y para investigaciones de identificación de haplotipos compartidos en colecciones del banco genético¹²⁶. Para los estudios en diversidad uno de los factores que determina el uso de una técnica es su vigencia y el costo. Por ello, si se tiene un gran número de cultivares a analizar se necesitarán aquellas técnicas que permitan evaluar grandes números de muestras y loci. Otro de los aspectos importantes al momento de elegir una técnica molecular es su capacidad para trabajar con gran cantidad de datos y establecer, mediante análisis estadísticos estimaciones de diversidad entre y dentro de las poblaciones en estudio (Selkoe y Toonen, 2006, mencionado por Roca)¹¹⁸.

2.2.11. Aislamiento de ADN

Los problemas en el aislamiento de ADN, específicamente de plantas, son la presencia de actividades de enzimas nucleasas tales como la ADNasa y de otras macromoléculas que son aisladas simultáneamente durante el proceso de purificación⁷².

El problema de las nucleasas se reduce mediante la remoción de cationes tales como el magnesio, que es necesario para la actividad de las mismas. Agentes como EDTA, EGTA y fenantrolina, se han usado en

diferentes protocolos y a diversas concentraciones, en función de las especies de las plantas o de animales. Además, detergentes como el deodecil sulfato de sodio (SDS) frecuentemente se utilizan para inhibir la actividad de las enzimas⁷².

Los investigadores en plantas frecuentemente encuentran macromoléculas no deseables al ADN, que crean dificultades en la técnica del aislamiento del mismo. Los problemas originados por la presencia de los compuestos fenólicos, pueden reducirse con la adición de polivinilpirrolidona (PVP) en concentraciones de 1% o mayor en el amortiguador del aislamiento inicial. Detergentes tales como SDS, disocian proteínas del ADN y lo hacen más accesible a la degradación por proteinasas usadas durante la técnica de aislamiento⁷².

Un reactivo utilizado en varios procedimientos es el bromuro de hexadeciltrimelamonio (CTAB), el cual se pega fuertemente al ADN, desplaza las proteínas y previene la degradación. El CTAB se remueve mediante extracciones con cloroformo, y el ADN permanece en fase acuosa y lista para ser precipitado con etanol. En algunas especies de plantas ha sido necesario aislar una fracción nuclear cruda en presencia de PVP, para quitar una gran porción de material citoplasmático antes de proceder con el CTAB⁷².

2.2.12. Etiquetado de ADN

La replicación de un ADN se puede inducir mediante calor o una alta concentración de sales y la presencia de Magnesio (Mg). La realineación del ADN se induce disminuyendo el calor y disminuyendo la concentración de sales, obteniendo así dos copias del ADN que se está estudiando.

Todo este proceso va acompañado por enzimas específicas. La enzima que adiciona y corrige nucleótidos se llama ADN polimerasa, y la que promueve la unión de los fragmentos nuevos se llama ADN ligasa.

El conocimiento de la replicación del ADN ha permitido abrir una puerta hacia las aplicaciones de la genética molecular, las cuales son:

- Etiquetado de sondas de ADN (marcado).
- Secuenciación de ADN (conocer las secuencias de las bases).
- Reacción en cadena de la polimerasa (permite aumentar millones de veces el ADN que se desea replicar a partir de una cantidad pequeña).

Estas aplicaciones buscan conocer la estructura del ADN de los organismos, estudiarlo, identificar y localizar genes de interés, insertar ciertos genes en el ADN de otros organismos para evaluar su expresión; todo ello enmarcado en programas de investigación y fitomejoramiento

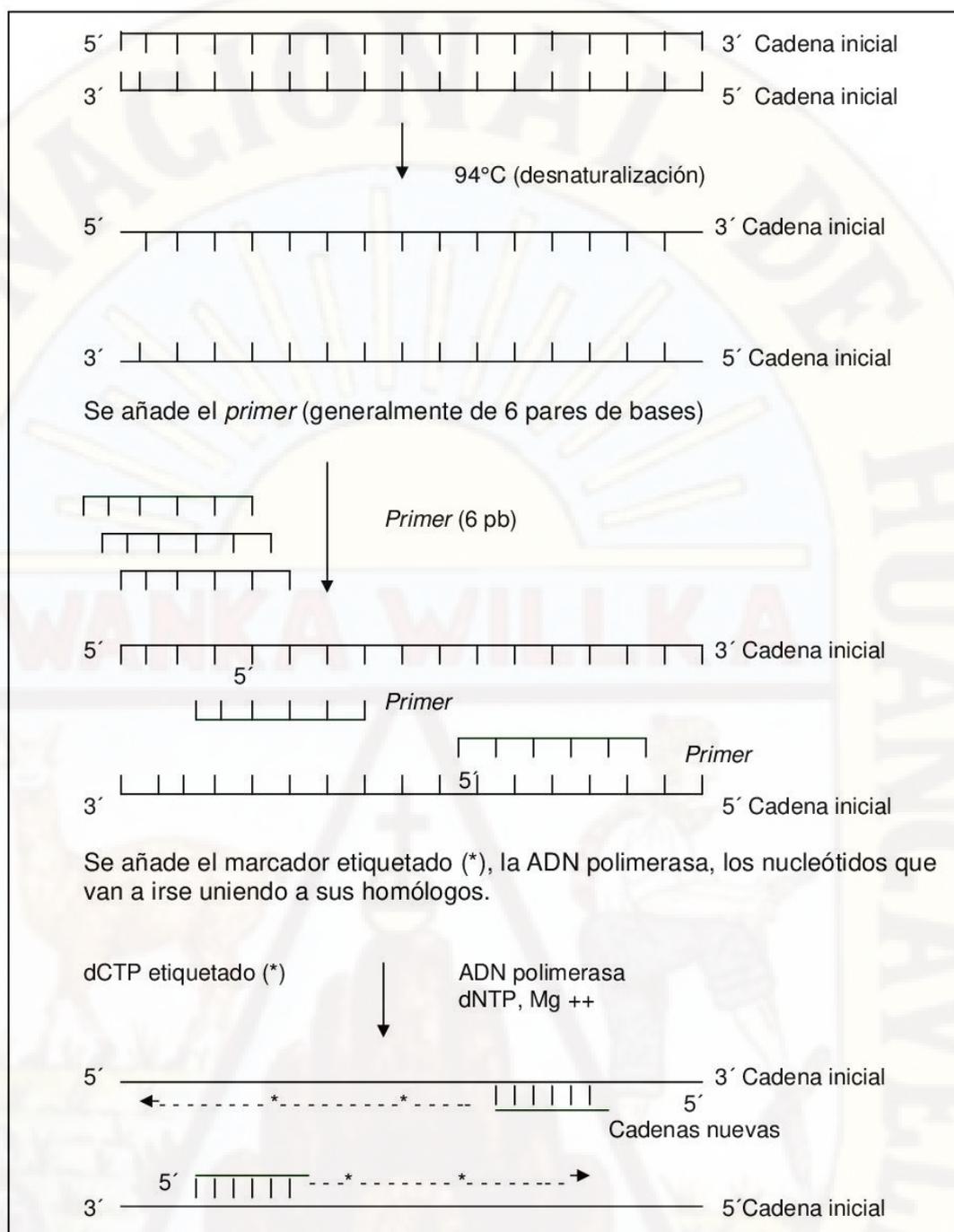


Figura 7. Proceso de etiquetado de ADN.

Fuente: Wilches, (2004)⁵⁵

avanzado. Cuando no se conoce la estructura del ADN, se puede hacer un etiquetado o marcado por un método conocido como “cebado al azar”. Este método consiste en aislar el ADN del organismo que se va a estudiar, para lo cual existen numerosas técnicas fáciles y altamente eficientes (Astorga & Quirós, 2004, citados por Wilches⁵⁵); y añadir a la mezcla de ADN y nucleótidos libres (A, T, C, G), una cadena de ADN conocida por el investigador que se unirá al azar en los sitios donde encuentren bases que coincidan. El primer paso es abrir o desnaturar

la cadena de ADN mediante calor (94° C), posteriormente el cebador o *primer* de secuencia conocida se une en los sitios donde encuentre una secuencia homóloga, luego se irán adicionando algunos nucleótidos que han sido marcados con radioactividad que permitirán ser visualizados en una etapa posterior⁵¹.

Posteriormente, todos los fragmentos de ADN que se obtienen se deben visualizar, para lo cual se hace una electroforesis en gel de agarosa, cuya metodología se describe más adelante⁵⁵.

2.2.13. Cuantificación de los ácidos nucleicos

Para cuantificar la cantidad de ADN/ARN, la lectura debe hacerse a longitudes de onda de 260nm, lo cual permite el cálculo de la concentración de los ácidos nucleicos en la muestra. Una DO = 1 corresponde aproximadamente a 50 µg/mL de ADN de doble cadena, 40 µg/mL del ADN de cadena sencilla y de ARN y 20 µg/mL de oligonucleótidos de cadena sencilla. La relación entre la lectura de absorbancia a 260 y 280 nm (DO_{260/280}) aporta una estimación de la pureza de los ácidos nucleicos. Las preparaciones puras de ADN y del ARN tienen valores que van desde 1.8 a 2.0 (DO_{260/280}) respectivamente. Si hay contaminación con proteínas o fenol, el valor obtenido es esta relación, puede ser significativamente diferente para los citados arriba y no será posible la cuantificación correcta de las moléculas⁷².

2.2.14. Determinación de la calidad de ADN

El grado de degradación del ADN puede ser estimado por la electroforesis de una alícuota de la muestra en geles de agarosa. El ADN de peso molecular alto aparece como banda definida en la parte superior del gel a poca distancia de los pocillos, mientras el material parcialmente degradado, forma un barrido (parecido a una mancha) de fragmentos pequeños a lo largo del carril haciendo que la definición de la banda citada, pierda su nitidez o no se aprecie. Algunas veces el ADN puede estar contaminado con otras sustancias que también absorben la radiación UV, como por ejemplo compuestos fenólicos y polisacáridos principalmente. La presencia de estos compuestos, puede evitar la interpretación correcta de la calidad e incluso, la cantidad de ácido nucleico que está siendo analizado. Una forma rápida de estimar la pureza de estas moléculas, es a través de la fluorescencia que emite el bromuro de etidio cuando está mezclado con ellas. Este compuesto químico tiene afinidad por moléculas del ADN, de manera que al irradiar el gel con una fuente de luz UV se puede apreciar la ubicación, calidad y cantidad de la molécula en cuestión. La cantidad de los ácidos nucleicos en la muestra, puede ser estimada al comparar el campo fluorescente de los mismos respecto a la serie de estándares utilizados (por ejemplo, ADN

del fago lambda o diluciones de ADSN cuantificado previamente en el espectrofotómetro)⁷².

2.2.15. Endonucleasas de restricción

Las endonucleasas de restricción se encuentran como parte de un mecanismo que utilizan para degradar al ADN extraño (exógeno). Son proteínas que se pegan particularmente a la doble cadena del ADN y la rompen en sitios específicos. El protocolo para el rompimiento con las endonucleasas de restricción, consiste simplemente en incubar el ADN con las enzimas bajo condiciones apropiadas. La cantidad de enzima, ADN y amortiguador (normalmente proporcionado por la casa comercial), así como la temperatura y la duración de la reacción, pueden variar dependiendo de la aplicación específica. Las enzimas de restricción son lábiles y costosas, siempre se deben de manipular en hielo y regresarse al congelador inmediatamente después de su uso (a -20°C)⁷².

2.2.16. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa, cuyas iniciales en inglés son PCR "polymerase chain reaction", es una técnica que fue desarrollada por Kary Mullis a mediados de los años 80. Con esta metodología se pueden producir en el laboratorio múltiples copias de un fragmento de ADN específico, incluso en presencia de millones de otras moléculas de ADN. Como su nombre indica, se basa en la actividad de la enzima ADN polimerasa que es capaz de fabricar una cadena de ADN complementaria a otra ya existente. Sus únicos requerimientos son que existan nucleótidos en el medio que son la materia base para fabricar el ADN (los nucleótidos de adenina, timina, citosina y guanina), y una pequeña cadena de ADN que pueda unirse a la molécula que queremos copiar para que sirva como cebadora (el cebador, en inglés "primer"). La sensibilidad de la técnica de PCR es muy alta pero presenta algunos inconvenientes, como son que no es una técnica cuantitativa y una relativamente alta probabilidad de obtener falsos positivos por contaminación. Para solventar este último problema se ha de optimizar la secuencia de los cebadores, así como la temperatura precisa para que estos se unan al ADN en la localización correcta y realizar una adecuada manipulación de los reactivos. Por otra parte para solventar el problema de la cuantificación se han generado unas variaciones sobre el esquema inicial de la PCR, dando lugar a lo que se conoce como PCR cuantitativa o PCR en tiempo real^{80, 81, 82, 83}.

Debido a la elevada sensibilidad de la técnica, uno de los puntos más importantes a la hora de realizar una PCR en Tiempo Real, es la calidad del material de partida. Por ello, la extracción de los ácidos nucleicos de la muestra toma un papel crítico y fundamental. Aunque en los últimos años se han hecho grandes progresos en la simplificación de la extracción y

purificación de los ácidos nucleicos bacterianos y virales de muestras clínicas, todavía no se ha encontrado un método automático universal que se pueda utilizar con cualquier tipo de muestra. En esta parte vamos a revisar algunos de los principios básicos que pueden ayudar a desarrollar tanto protocolos nuevos de extracción como a mejorar los ya existentes eliminando el uso de soluciones peligrosas, centrifugaciones y múltiples pasos^{81, 82, 86, 87}.

La Reacción en Cadena de la Polimerasa, es un procedimiento *in vitro* para la síntesis y duplicación de secuencias específicas de ADN. Esta tecnología utiliza secuencias de uno o dos oligonucleótidos sintéticos (iniciadores), generalmente de entre 10 a 30 pares de bases de longitud y complementarios a la secuencia nucleotídica de los extremos del ADN blanco y diseñados para hibridar en dirección contraria. El método implica la ejecución de una serie repetitiva de ciclos (conocidos como ciclos térmicos), cada uno de los cuales involucra: desnaturalización, hibridación y extensión. Lo anterior resulta en una acumulación exponencial de un fragmento específico de ADN. La ADN polimerasa es una enzima que cataliza la síntesis de ADN a partir de desoxirribonucleótidos y de una molécula de ADN plantilla o molde. Tras la acción de la ADN polimerasa, y una vez que se han eliminado y añadido alrededor de unas 10 bases, interviene la enzima ADN ligasa que une los extremos libres del fragmento recién formados con el resto de la cadena, recuperando así el ADN su estructura normal. Los protocolos básicos de PCR constan de los siguientes pasos fundamentales: desnaturalización, hibridación y polimerización^{83, 84, 85}.

El PCR tiene varios requerimientos, entre los cuales es indispensable un molde de ADN, moléculas iniciadoras llamadas “primers”, una enzima ADN polimerasa resistente a las fluctuaciones de temperatura, una mezcla de desoxirribonucleótidos trifosfatos (dATP, dCTP, dGTP y dTTP), un amortiguador apropiado y un equipo llamado “termociclador” que tiene la capacidad de cambiar las temperaturas dependiendo del ciclaje programado. La PCR consiste en tres pasos esenciales: el primero es la desnaturalización y sirve para separar mediante temperatura (94°C) la molécula doble de ADN a cadenas sencillas, que servirán como moldes para la síntesis del (o los) fragmento respectivo. En el segundo paso la temperatura se reduce para permitir el alineamiento (o reconocimiento) de las moléculas iniciadoras a la secuencia blanco del ADN molde. Las moléculas iniciadoras pueden variar en longitud, composición de bases nitrogenadas y especificidad para parearse con la secuencia blanco y dependiendo de esto, la temperatura de alineamiento puede variar desde 25°C a 65°C. En el tercero se lleva a cabo el alargamiento o extensión de la molécula iniciadora mediante la enzima ADN polimerasa a 72°C. Lo más recomendable es que el ADN polimerasa seleccionada tolere la

temperatura de desnaturalización y se mantenga activa durante el número de ciclos que se requieran; por ejemplo en muchas investigaciones se utiliza la ADN polimersa *Taq*, proveniente de la bacteria termófila *Termus aquaticus*, debido a que tolera la temperatura de desnaturalización sin alterar su función de polimerización. Estos 3 pasos (ciclos) se repiten en el termociclador, permitiendo obtener de manera exponencial el fragmento o fragmentos discretos sintetizados a partir del molde de ADN; por ejemplo, en una reacción de 30 a 35 ciclos, se acumularán alrededor de 10^6 a 10^8 moléculas de ADN⁷².

2.2.17. Electroforesis.

La concentración e integridad del ADN extraído, así como el tamaño de distintos fragmentos de ADN (por ejemplo, productos de PCR) pueden ser verificadas mediante electroforesis en geles de agarosa o poliacrilamida. La electroforesis consiste en la separación de moléculas (proteínas, isoenzimas, ácidos nucleicos) a través de una matriz tamponada (agarosa, acrilamida, almidón). La matriz funciona como un filtro, separando las moléculas en un campo eléctrico, de acuerdo al tamaño y la carga neta que poseen. En el caso de los ácidos nucleicos, el grupo fosfato es el responsable por la fuerte carga negativa en condiciones de pH neutro, haciendo que los fragmentos migren hacia el polo positivo (ánodo) durante la electroforesis^{72, 86}.

La resolución y velocidad de separación de fragmentos de ADN por electroforesis son reguladas a través de la concentración de agarosa (o acrilamida) en el gel y el voltaje aplicado durante la electroforesis. Los ácidos nucleídos separados en geles de agarosa pueden visualizarse mediante tinción con colorantes fluorescentes, lo cual permite evaluar su integridad y estimar su concentración mediante un análisis comparativo con patrones de concentración conocida. Los colorantes fluorescentes actúan mediante inserción entre las pares de bases que conforman el ácido nucleico. El bromuro de etidio es ampliamente utilizado para la visualización de ADN y ARN. Sin embargo, éste es un reactivo altamente tóxico, con propiedades mutagénicas, por lo que debe ser manejado con extremo cuidado en el laboratorio. En la actualidad existen colorantes fluorescentes alternativos, como SYBR Safe, SYBR Gold, SYBR Green I, Vistra Green y Syto60, desarrollados específicamente para reducir los riesgos potenciales de mutagénesis^{72, 85, 86}.

Electroforesis en geles de agarosa o poliacrilamida es el método estándar utilizado para separar, identificar y purificar los fragmentos de ADN. El proceso de separación por electroforesis depende básicamente del tamaño del fragmento, de la concentración de la agarosa y del voltaje aplicado durante la electroforesis. La agarosa se comporta como filtro, separando los fragmentos de diferentes tamaños; se observa que los

fragmentos menores migran más rápidamente en dirección al polo positivo, mientras que los fragmentos de mayor longitud migran lentamente. De esta manera, los fragmentos de diferentes tamaños son separados a lo largo del gel de agarosa. Al incrementar la concentración de agarosa se dificulta el movimiento de los fragmentos a lo largo de la superficie, permitiendo obtener una mayor resolución en la separación de fragmentos de menor longitud. Mientras que la reducción de la concentración favorece la separación de fragmentos mayores. El incremento del voltaje aumenta proporcionalmente la velocidad de migración de los fragmentos a lo largo de la matriz^{27, 86, 87}.

2.3. Marco conceptual

Las papas nativas son cultivares que los agricultores altoandinos conservan en sus campos de cultivo desde los inicios de la domesticación del cultivo de la papa, en el transcurso de la historia del hombre andino las papas cultivadas han ido diversificándose en diversas variedades que se diferencian en sus formas, colores, tamaños y usos, muchos de ellos resistentes a la sequía, heladas, plagas y enfermedades, es decir, constituido por diversidad de genes generando diversidad morfológica que indica que existe variabilidad en los marcadores moleculares que sirve generalmente para buscar genes de interés para utilizar en el mejoramiento genético.

Por el lado del cultivo de las papas nativas, observamos que la biodiversidad de este tipo de tubérculos se ve amenazada por la presencia de variedades mejoradas, en lo que se denomina erosión genética. Se ha producido una mayor incidencia de plagas y enfermedades como consecuencia directa del incremento de las temperaturas, al igual que una reducción de los rendimientos ante fenómenos como heladas, sequías, granizadas, degradación del suelo, etc. Actualmente, la reducción de la biodiversidad, sin embargo, es el principal riesgo al que se enfrenta el cultivo de papas nativas⁴⁰.

Caracterizar a las papas nativas es clasificar, identificar, separar y diferenciar unas papas de las otras en base a sus características propias de cada variedad de papas que diferencia de las demás en la forma y color de los tallos, color de la flor, forma del fruto y del tubérculo, color de la piel y de la pulpa. Clasificar es seleccionar las diferentes variedades de papas (*Solanum* spp.) en base a ciertos caracteres que lo convierten en mejor variedad sobre las demás, teniendo en cuenta las preferencias tanto de los agricultores y consumidores, los caracteres preferidos son: nivel de adaptación, resistencia a plagas y enfermedades, precocidad, tamaño, calidad, color de la piel y pulpa del tubérculo. Un cultivar moderno de papa requiere de la combinación de 50 o más caracteres importantes como es el caso de mayor rendimiento, que es el producto de

la combinación de factores morfológicos, fisiológicos y ontogenéticos, adaptación a técnicas de manejo en el campo, como son el aporque, control de malezas y distancia de siembra en la cosecha y en el almacenamiento resistencia a los factores adversos, abióticos (heladas, sequía, suelos salinos, etc.) y bióticos (enfermedades, insectos, nematodos) y calidad de acuerdo con los fines para los cuales se destina la papa (sólidos totales, compactación, azúcares reductores, tiempo de cocción, propiedades organolépticas, verdeamiento en almacén, contenido de glicoalcaloides, etc.). Para encarar estos factores se requiere conocer cómo se heredan estos caracteres. Cuando la herencia se debe a factores mendelianos simples, se pueden obtener progenies seleccionadas con los caracteres deseados. Esto permite una selección temprana en plántulas para reducir la población en estudio, especialmente en la selección de caracteres bióticos y abióticos^{46, 54}.

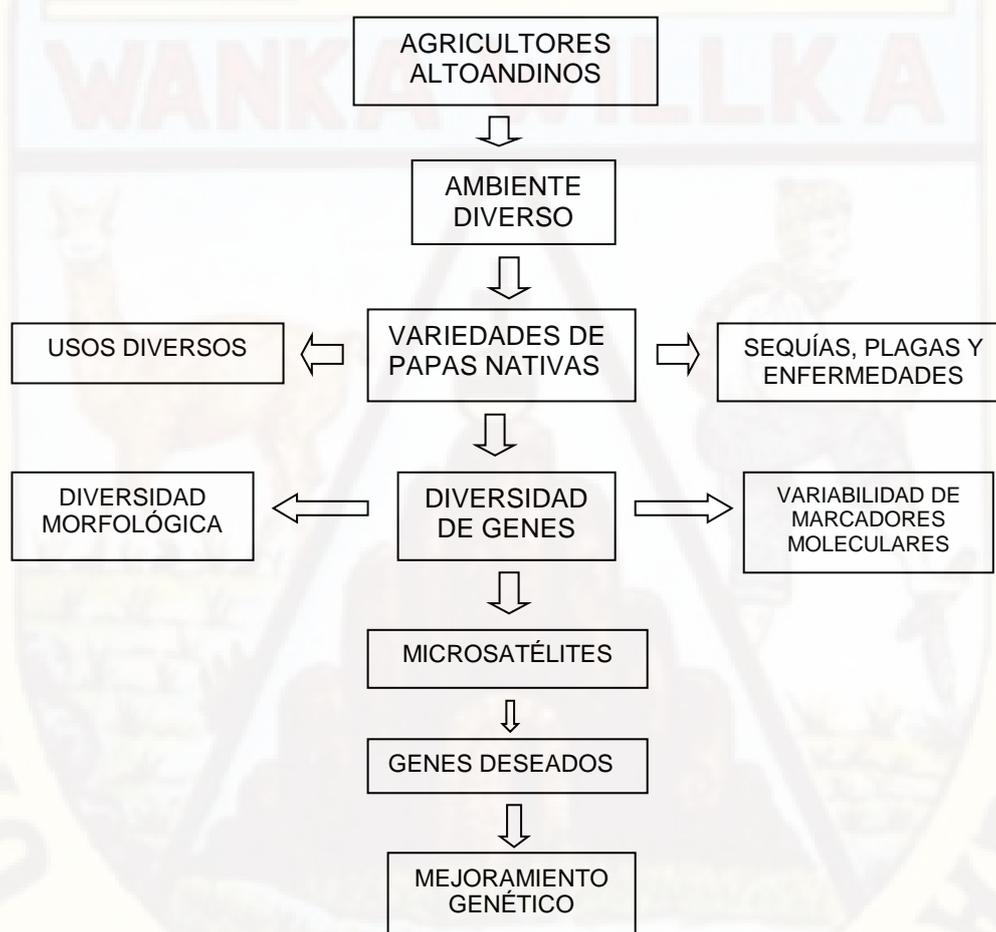


Figura 8. Cuadro sinóptico de marco conceptual de *Solanum tuberosum* spp. “papa” de tres distritos de los departamentos de Ayacucho y Huancavelica.

Para los países del área andina, especialmente para Ecuador, Bolivia y Perú, las variedades nativas de papa se constituyen en productos que tienen un potencial comercial interesante. En estos tiempos de globalización de los mercados, la diferenciación es una estrategia

oportuna para poder competir. Las papas nativas son efectivamente diferentes a las variedades mejoradas en color, sabor, formas y propiedades nutritivas. Las comunidades altoandinas que han preservado este legado cultural, tienen ahora la posibilidad de incursionar en los mercados urbanos y modernos, tanto locales como internacionales, con variedades de papa únicas en el mundo, siendo necesario identificar las oportunidades, los segmentos de demanda y las formas de presentación donde introducir, posicionar y consolidar su oferta. Las variedades nativas de papa se encuentran en una situación crítica, tanto por el lado de la oferta como de la demanda. Su presencia comercial en los mercados es limitada y su conocimiento y hábito de consumo ha disminuido de manera considerable en la población, siendo necesario desarrollar de manera participativa acciones orientadas a recuperar los espacios perdidos¹³.

La conservación de las papas nativas no sólo es importante porque representan un banco de diversidad genética para el futuro, sino que permite a los agricultores aprovecharlas en diferentes ambientes, condiciones, tecnologías, usos y mercados para su producción. Además, su mayor uso puede contribuir a la valorización y conservación genética por los mismos agricultores, siendo una excelente alternativa para los bancos de germoplasma 'ex-situ' de los programas internacionales y nacionales de mejoramiento¹³.

Finalmente, las comunidades altoandinas que basan su seguridad alimentaria en la papa nativa son un elemento esencial que no podemos perder de vista. En tal sentido, lo que ocurra con el cultivo de la papa será importante para que las familias en las comunidades puedan asegurar su autosubsistencia. Aquí, el conocimiento local juega un rol fundamental como elemento que puede ayudar en el manejo del cultivo, el conocimiento del clima en el entorno altoandino y en las estrategias enfocadas en la conservación de la biodiversidad. También es importante entender que la conservación de la biodiversidad en este contexto está directamente relacionada con el conocimiento local y el aseguramiento de la autosubsistencia de las familias de la zona y esto puede afectar la seguridad alimentaria de las familias, manteniéndose o incrementándose los niveles de pobreza⁴⁰.

2.4. Marco filosófico

La epistemología, como teoría del conocimiento, resulta necesaria e imprescindible en la Tesis de Post Grado porque se sustenta -a su vez- en la base filosófica necesaria para la defensa del paradigma que se propone, teniendo en cuenta que los paradigmas son conjuntos de conocimientos y creencias que forman una teoría hegemónica en determinado periodo histórico. El paradigma está constituido por supuestos teóricos, leyes y técnicas de aplicación que deberán adoptar

los investigadores dentro de una comunidad científica. Por tanto, cada nuevo paradigma aporta respuestas a los enigmas que no podían resolverse con el paradigma anterior, además de otorgarle el sustento académico a toda tesis¹³⁵.

La Epistemología (del griego episteme, que significa conocimiento, logos, teoría), es la rama de la filosofía que trata de los problemas filosóficos que rodean la teoría del conocimiento. La epistemología se ocupa de la definición del saber y de los conceptos relacionados, de las fuentes, criterios, tipos de conocimiento posible y el grado con el que cada uno resulta cierto; así como la relación exacta entre el que conoce y el objeto conocido. El método científico, se entiende como “el estudio sistemático, controlado, empírico y crítico de proposiciones hipotéticas acerca de presuntas relaciones entre varios fenómenos”. El método científico es un procedimiento que aplicamos en las ciencias y se inicia con la observación¹³⁵.

El planeta Tierra vive un período de intensas transformaciones técnico-científicas como contrapartida de las cuales se han engendrado fenómenos de desequilibrio ecológico que amenazan, a corto plazo, si no se le pone remedio, la conservación de la vida sobre su superficie. Aunque recientemente muchos países han iniciado una toma de conciencia parcial de los peligros más latentes que amenazan el entorno natural de nuestras sociedades, en general se limitan a abordar el campo de la contaminación industrial, pero exclusivamente desde una perspectiva tecnocrática, cuando en realidad es sólo una articulación ético-política que Guattari (2008), citado por De la Cruz (2011)⁸⁸, llamó **ecosofía** entre los tres registros ecológicos: el del medio ambiente, el de las relaciones sociales y el de la subjetividad humana. Sin embargo, no se considera el valor de la conservación de la biodiversidad vegetal y animal como componente de gran importancia para el equilibrio ecológico y la seguridad alimentaria de la población humana, en la que se encuentra inmerso la diversidad de papas nativas, que básicamente se encuentran en los diferentes pisos ecológicos del ámbito geográfico de la cordillera de los Andes; en la que la Sierra del Perú es una de las zonas que mantiene esta riqueza natural. Esta adaptación tiene que ver con atributos agronómicos y mecanismos fisiológicos que expresa la planta para tolerar a las sequías, heladas, plagas, enfermedades y actualmente al cambio climático, entre ellos el estrés por temperatura¹⁰. El conocimiento local de las familias altoandinas ha jugado un rol esencial en la conservación de la biodiversidad de las papas nativas. Se sabe que poseen una adecuada información de los diversos atributos de dicha planta y que entre ellos existen niveles taxonómicos andinos muy distintos a los planteados en los esquemas formales⁸⁹. Este último sugiere prácticas de conservación de la biodiversidad de papas adecuadas a su ecosistema, con evidencias que

sugieren que dicho conocimiento local posee adicionalmente estrategias viables para la conservación in situ⁹⁰. Esta labor de conservación se sustenta en los patrones culturales de cada comunidad, habiéndose establecido un vínculo muy estrecho entre el mantenimiento de las papas nativas y las actividades cotidianas al interior de las comunidades altoandinas. Se identificaron que la biodiversidad de papas nativas está más vinculada al autoconsumo y a la seguridad alimentaria de la comunidad, precisamente allí donde los riesgos climáticos y los niveles de pobreza son más altos⁹¹.

El problema es saber y conocer de qué forma se va a vivir de aquí en adelante sobre este planeta, en el contexto de la aceleración de los cambios técnico-científicos y del considerable crecimiento demográfico. Las fuerzas productivas, debido al desarrollo continuo del trabajo de la máquina, multiplicado por la revolución informática, están liberando una cantidad cada vez mayor del tiempo de actividad humana potencial.

¿Cuáles son las causas de la crisis ambiental contemporánea? ¿Quién es, o quiénes son los responsables? ¿Qué alternativas se plantean? Estas son algunas de las preguntas que se buscan responder con pensamientos ambientalistas dada la diversidad de fundamentos filosóficos, epistemológicos e intereses presentes.

Pierre y Foladori⁹², partiendo de la relación entre lo natural y lo artificial, y la valoración que de ambos se ha hecho a lo largo de la historia, propone una clasificación en base a dos características: el punto de partida ético y la forma en que se considera la sociedad humana.

Según el primer criterio, considera a **dos corrientes**:

- a. *La biocentrista*, que sostiene una valoración intrínseca de la naturaleza, y
- b. *La antropocentrista*, que considera el interés humano como guía de su relación con el entorno.

Tomando el segundo criterio, Pierri y Foladori explican la existencia de **dos visiones** contrapuestas: aquella que toma al **género humano como un todo**, y la que considera a la **sociedad humana dividida en clases** históricamente determinadas. Además de la tipología que propone, en base a fundamentos filosóficos e ideológicos, hay que tener en cuenta que Foladori subraya la importancia de la evolución – y las disputas – del conocimiento científico en el ámbito de la biología, la ecología, la genética, la física y la termodinámica, el cual ha servido también como fundamento para las respectivas posturas⁹².

Zimmerman⁹³, delimita el campo de la filosofía ambiental, ligado a los movimientos culturales de fines de 1960, que formulan una crítica a la modernidad, y a toda noción asociada a él, como la civilización occidental,

el progreso, el capitalismo, a los que considera como los orígenes de la crisis ambiental. La filosofía ambiental es ubicada dentro de la esfera de la filosofía práctica, que trata de una diversidad de cuestiones, desde el feminismo a la ética en los negocios.

Zimmerman⁹³ reconoce tres campos dentro de la filosofía ambiental, con sus respectivas corrientes.

- a. El primero, es el **eco-filosofía radical**, asociada con los aludidos movimientos contraculturales. Su carácter radical está dado porque su análisis va a los orígenes culturales, sociales y políticos de la crisis, y bregan por un cambio cultural o una revolución como alternativas para salvar al mundo de la catástrofe ambiental. A este campo pertenecen: la **Ecología Profunda**, el **Ecofeminismo** y la **Ecología Social**, quienes toman respectivamente al antropocentrismo, el patriarcado y la jerarquía social sostenida por la dominación, como las causas de la crisis ambiental.
- b. El segundo campo es la **ética ambiental**, según la cual es posible establecer una relación armoniosa entre los humanos y el entorno a partir de un cambio en nuestras actitudes antropocéntricas y la consideración de una moral específica para las formas de vida no humanas. Aquí hay toda una gama de corrientes, que va desde posiciones más extremas, próximas a la Ecología Profunda, hasta un antropocentrismo débil, que brega por los derechos de los animales y la preservación de áreas naturales.
- c. El tercer campo, es el **reformismo antropocéntrico**, para cuyas corrientes no existe una causa existencial ni política de la crisis ambiental, sino que la misma se debe a ignorancia, avaricia y cortedad de miras por parte de los seres humanos. De manera que una legislación, una educación y una orientación económica adecuadas (en este punto se muestran proclives a la propiedad privada, que aseguraría un mayor cuidado de los bienes ambientales) son las medidas que deben tomarse para superar dicha crisis⁹⁴.

Estas corrientes se presentan normalmente, en estado químicamente puro. Asimismo, debemos entender que las actividades y acciones que realiza la humanidad deben considerar tener el sentido fomentar el uso eficiente de los recursos, la armonía medio ambiental y un orden social justo y equitativo, sin egoísmo, pero con oportunidad para todos los presentes y futuros descendientes de la humanidad. Además, la investigación, también, se halla fortalecido filosóficamente por el Empirismo lógico propuesto por el Círculo de Viena con Rudolf Carnap y otros, citado por Sánchez (2011)⁹⁵, al postular que el método científico tiene como herramientas únicas a la experimentación y las observaciones objetivas para conocer el mundo real y las leyes.

Ante todos los testimonios anteriormente mencionadas se puede inferir la obligación de establecer como requisito necesario e indispensable en las tesis de posgrado que se ejecutan en la distintas universidades en sus unidades de posgrado, particularmente en la Unidad de Posgrado de la Facultad de Ciencias de Ingeniería de la Universidad Nacional de Huancavelica, se debe presentarse el Marco Filosófico que brinde una mayor consistencia académica y científica al paradigma que contiene o deben proyectarse los trabajos de investigación de sus egresados que aportarán conocimientos y experiencias de los recursos naturales que se encuentran en su zona de influencia, específicamente en el presente trabajo de investigación se refiere a la biodiversidad de las papas semisilvestres, nativas y mejoradas que participan en la seguridad alimentaria de los pobladores alto andinos de Huancavelica y Ayacucho, porque en la actualidad, la producción de las papas nativas está orientada al autoconsumo y circunscrita al ámbito de las comunidades andinas rurales, por la introducción de las variedades mejoradas que cuenta con mayores perspectivas en el mercado, por la presencia limitada de las nativas en los mercados.

2.5. Formulación de hipótesis

Hipótesis general

- Diversidad de papas (*Solanum spp.*) de los distritos Seclla, Santo Tomás de Pata y Santillana difieren en sus características de marcadores moleculares microsatélite por ser un carácter intrínseco.

Hipótesis específicos

- Los perfiles moleculares difieren entre la diversidad de papas (*Solanum spp.*) de los distritos de Seclla, Santo Tomás de Pata y Santillana.
- Existe alta variabilidad en los marcadores moleculares microstaélites de la diversidad genética de papas (*Solanum spp.*), procedentes de los distritos de Seclla, Santo Tomás de Pata y Santillana.
- Las distancias genéticas de los marcadores moleculares microstaélites de la diversidad genética de papas (*Solanum spp.*), procedentes de los distritos de Seclla, Santo Tomás de Pata y Santillana son diferentes.

2.6. Identificación de variables

Variable independiente:

- Diversidad de papas (*Solanum spp.*).

Variable dependiente:

- Perfiles moleculares microsatélites de diversidad genética.
- Variabilidad de marcadores moleculares microsatélites.
- Distancia genética de marcadores moleculares microsatélite.

2.7. Definición operativa de variables e indicadores

2.7.1. Matriz de operacionalización de variables

VARIABLE	DEFINICIÓN OPERACIONAL	DIMENSIÓN	INDICADOR	CATEGORÍA/ ESCALA	CRITERIOS DE MEDICIÓN DE LAS CATEGORÍAS	TIPOS DE VARIABLES
<p>Variable independiente:</p> <p>Diversidad de papas (<i>Solanum spp.</i>)</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Segmento particular de ADN que permite detectar diferencias a nivel genómico entre los organismos. • Caracterización de marcadores microsatélites de la diversidad de papas (<i>Solanum spp.</i>). De los distritos de Secclla y Santo Tomás de Pata provincia de Angaraes región Huancavelica y distrito de Santillana provincia de Huanta Ayacucho. 	Biología molecular	Diversidad de papas (<i>Solanum spp.</i>).	Los perfiles moleculares dependen de la diversidad de papas (<i>Solanum spp.</i>).	Polimorfismo, pares de bases (pb) y número de microsatélites.	Cuantitativa discreta
<p>Variable dependiente:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Perfil molecular basado en microsatélites. • Variabilidad de marcadores moleculares microsatélites. • Distancia genética de marcadores moleculares microsatélite. 	<ul style="list-style-type: none"> • Variabilidad genética de la diversidad de papas (<i>Solanum spp.</i>). • Siembra de accesiones de papas (<i>Solanum spp.</i>). • Muestreo de hojas tiernas. • Obtención de ADN. • PCR. • Electroforesis. • Lectura de bandas. 	Agrícola	<ul style="list-style-type: none"> • Perfil molecular según microsatélites • Variabilidad genética. • Distancia genética. 	Perfil molecular, variabilidad y distancias genéticas dependen de la diversidad papas (<i>Solanum spp.</i>).	Mono, Di, tri o tetra nucleótidos que están distribuidos en tándem a lo largo del genoma	Cuantitativa discreta

CAPÍTULO III

METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

3.1. Tipo de la investigación

Debido a las características de la muestra y al problema de la investigación, se trata de un estudio de tipo investigación básica en vista que el estudio tiene como propósito encontrar las Repeticiones de Secuencia Simple (SSR) de ADN que determinará grados de variabilidad de la diversidad de papas (*Solanum spp.*). La investigación se llevó a cabo con accesiones procedentes del distrito de Santillana provincia de Huanta región Ayacucho y los distritos de Secclla y Santo Tomás de Pata provincia de Angaraes región Huancavelica.

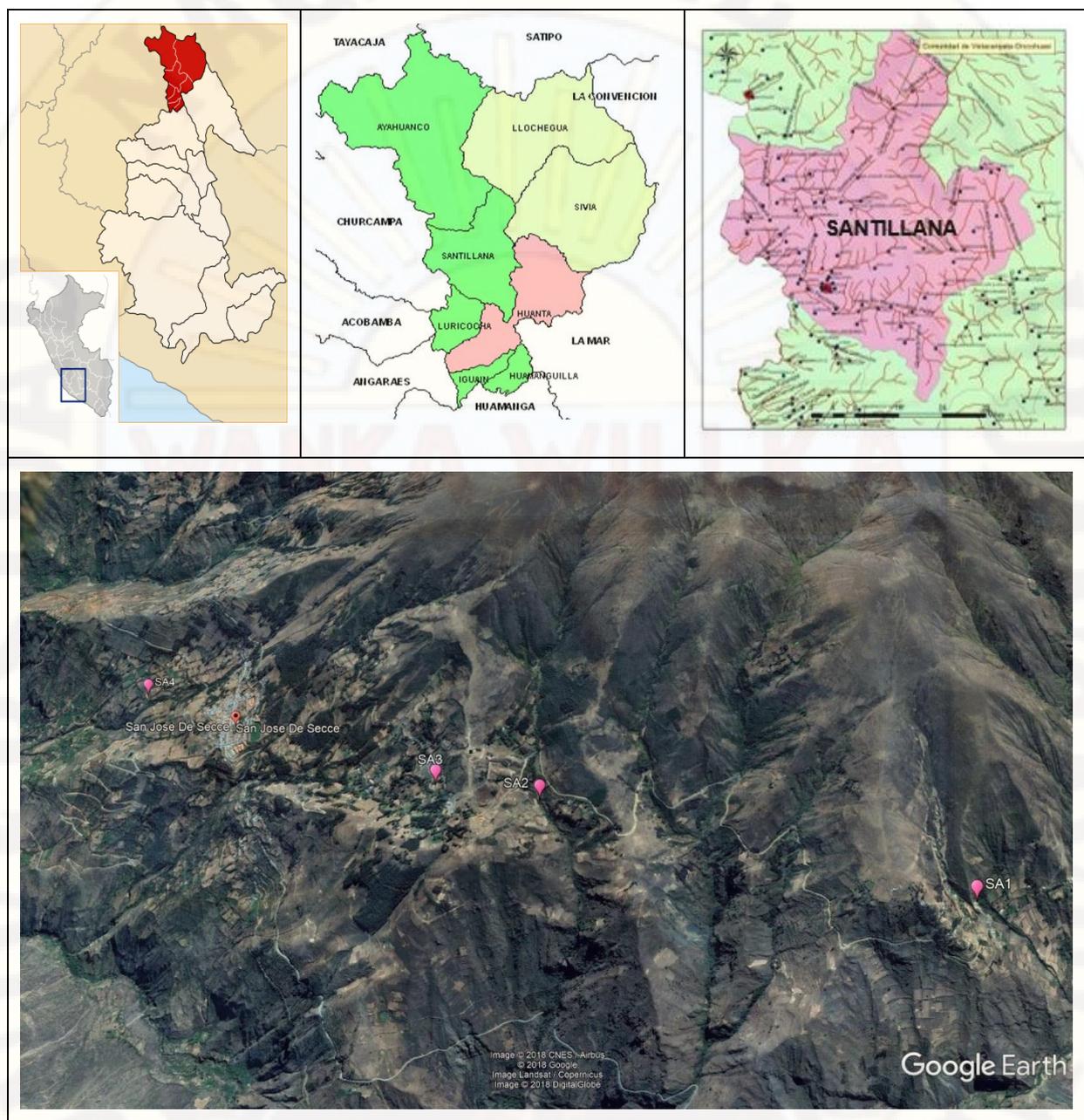


Figura 9: Ubicación del distrito de Santillana provincia de Huanta región Ayacucho y georreferenciación de los puntos de muestreo, según Google Earth

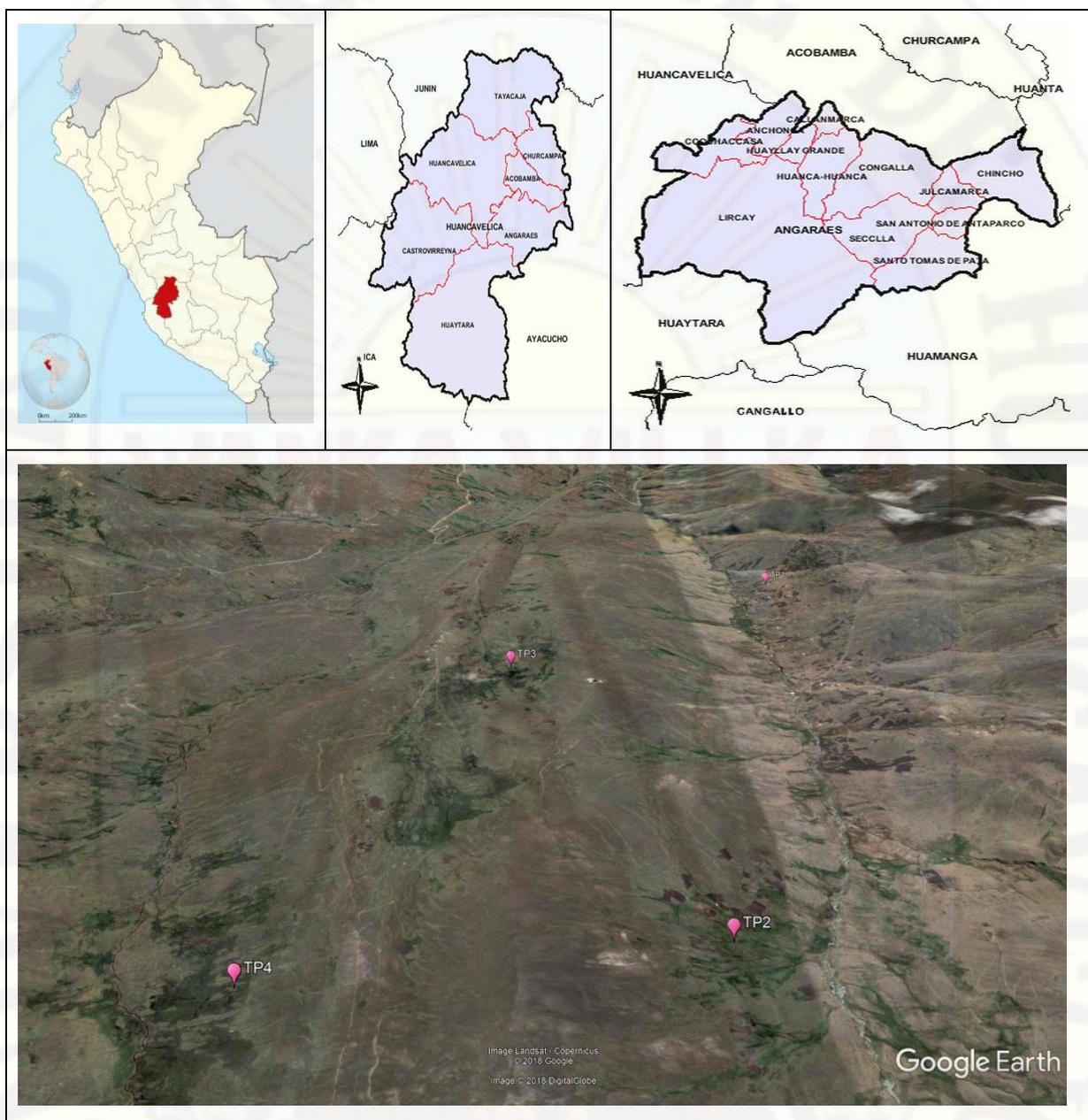


Figura 10: Ubicación del distrito de Santo Tomás de Pata provincia de Angaraes región Huancavelica y georreferenciación de los puntos de muestreo, según Google Earth

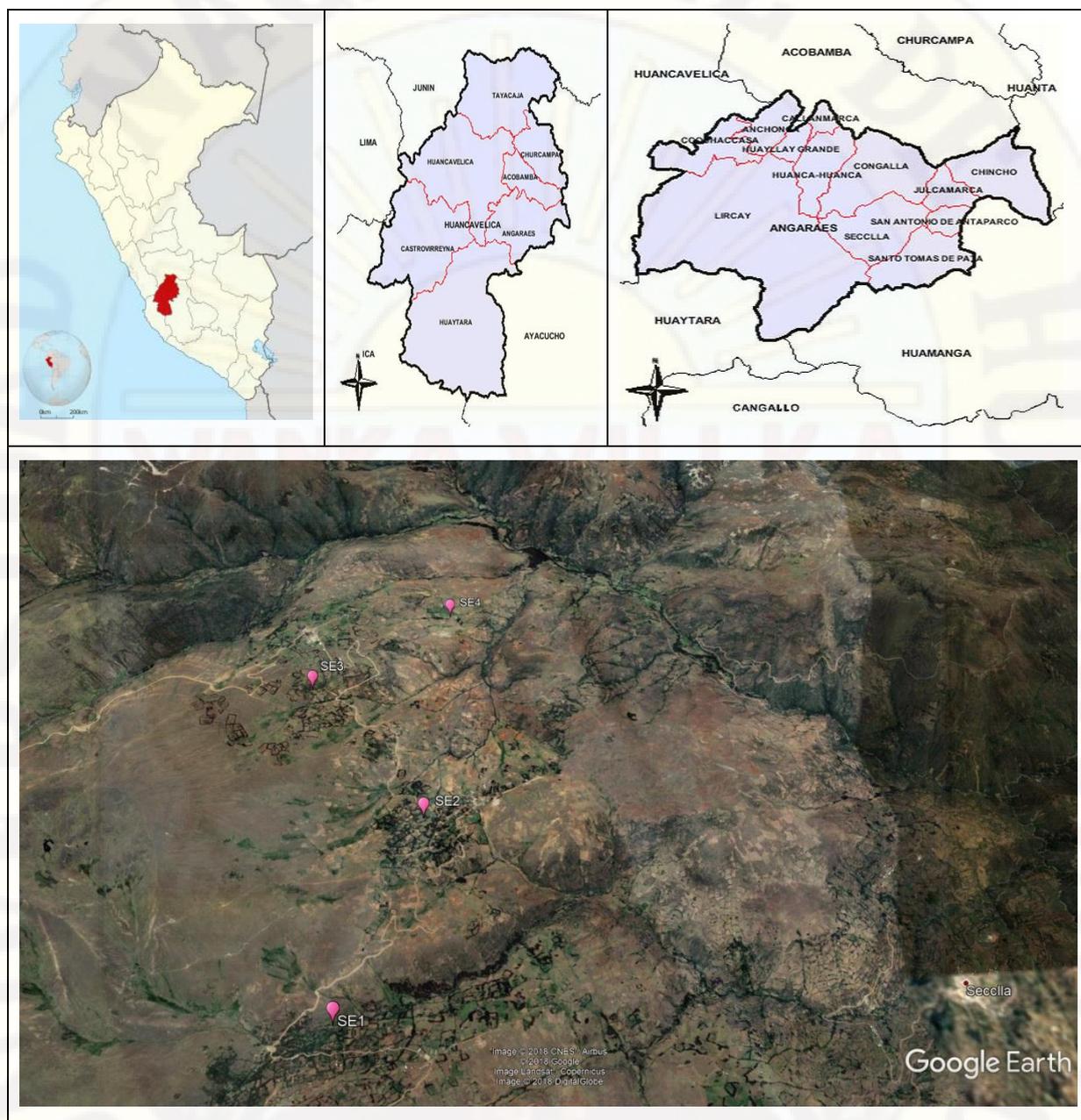


Figura 11: Ubicación del distrito de Secclla provincia de Angaraes región Huancavelica y georreferenciación de los puntos de muestreo, según Google Earth

3.2. Nivel de investigación

Es una investigación descriptiva y correlacional.

3.3. Métodos de investigación

3.3.1. Colección de muestras de tubérculos de papas (*Solanum spp.*)

Tabla 2. Relación de accesiones de papas (*Solanum spp.*) colectados en el distrito de Santillana para análisis microsatélites.

Accesiones de <i>Solanum spp.</i> "papa" de Santillana					
1. Qillqay wali SA1	2. Huamantanga SA1	3. Yuraq chituriano SA1	4. Yuraq winqus SA1	5. Pukrus warmi SA1	6. Wañaquin SA1
7. Ritipa sisan SA1	8. Munupa sillun SA1	9. Saco largo SA1	10. Puka Marquina SA1	11. Platanal SA1	12. Tuyrus SA1
13. Vizcochuelo SA1	14. Padripa rinrin SA1	15. Unica SA1	16. Qarazapato SA1	17. Nuvillupa waqran SA2	18. Chuko SA2
19. Waraqupa murun SA2	20. Llama kurul SA2	21. Tantas SA2	22. Chipipa rinrin SA2	23. Qayqa mendes SA2	24. Puka pumapa makin SA2
25. Pallay chuncho SA2	26. Quti papa SA2	27. Huayro macho SA2	28. Chontapa murun SA3	29. Wira pasña SA3	30. Qumpis SA3
31. Kuchipa akan SA3	32. Guinda ribusa SA3	33. Yana pumapa makin SA3	34. Muru huayro SA3	35. Puka wali SA3	36. Yana huayro SA3
37. Muru wañaquin SA3	38. Puka wañaquin SA4	39. Yuraq sisa 40. SA4	41. Uchku puyru SA4	42. Yana palta waña SA4	43. Puka challwina SA4
44. Chaulina SA4	45. Peruanita 46. SA4	47. Pukia 48. SA4	49. Yungay SA4	50. Canchan SA4	51. Mariva 52. SA4
53. Araq papa SA4					

Tabla 3. Puntos de muestreo con coordenadas UTM y altitud según Google Earth de Santillana

Puntos de muestreo	Coordenadas UTM	Altitud msnm
SA1	12°46'38.10"S 74°13'8.07"O	3590
SA2	12°46'20.87"S 74°14'13.21"O	3596
SA3	12°46'18.15"S 74°14'29.86"O	3607
SA4	12°45'47.74"S 74°15'29.50"O	3053

Tabla 4. Relación de accesiones de papas (*Solanum spp.*) colectados en el distrito de Santo Tomás de Pata para análisis microsatélites.

Accesiones de <i>Solanum spp.</i> "papa" de Santo Tomás de Pata					
54. Puka rosas TP1	55. Yana rosas TP1	56. Yana muru rosas TP1	57. Yuraq rosas TP1	58. Allqa rosas TP1	59. Sirina TP1
60. Uqi chiqchi pasña TP1	61. Muru chaulina TP1	62. Lenguas TP1	63. Cusqueña TP1	64. Yuraq palta waña TP1	65. Bomba TP1
66. Macho huayro TP1	67. Puka muru winqus TP1	68. Qillu azul sunqu TP1	69. Qaragallo TP1	70. Punkina TP2	71. Quwipa sullun TP2
72. Alcarraz TP2	73. Muru pillpintu TP2	74. Huancaína TP2	75. Puka pinya TP2	76. Yana Gaspar TP2	77. Sara palta TP3
74. Puquli TP3	75. Muru chituriano TP3	76. Yuraq chituriano TP3	78. Yuraq challwina TP3	79. Sarda yuka TP3	80. Puka huayro TP3
81. Wachwapa qallun TP3	82. Wamanpa uman TP4	82. Yana muru wira pasña TP4	83. Runtus TP4	84. Yana chaulina TP4	85. Yana imilla TP4
86. Aymara TP4	87. Yana ribusa TP4	88. Chanchamaina TP4	89. Araq papa TP4		

Tabla 5. Puntos de muestreo con coordenadas UTM y altitud según Google Earth de Santo Tomás de Pata

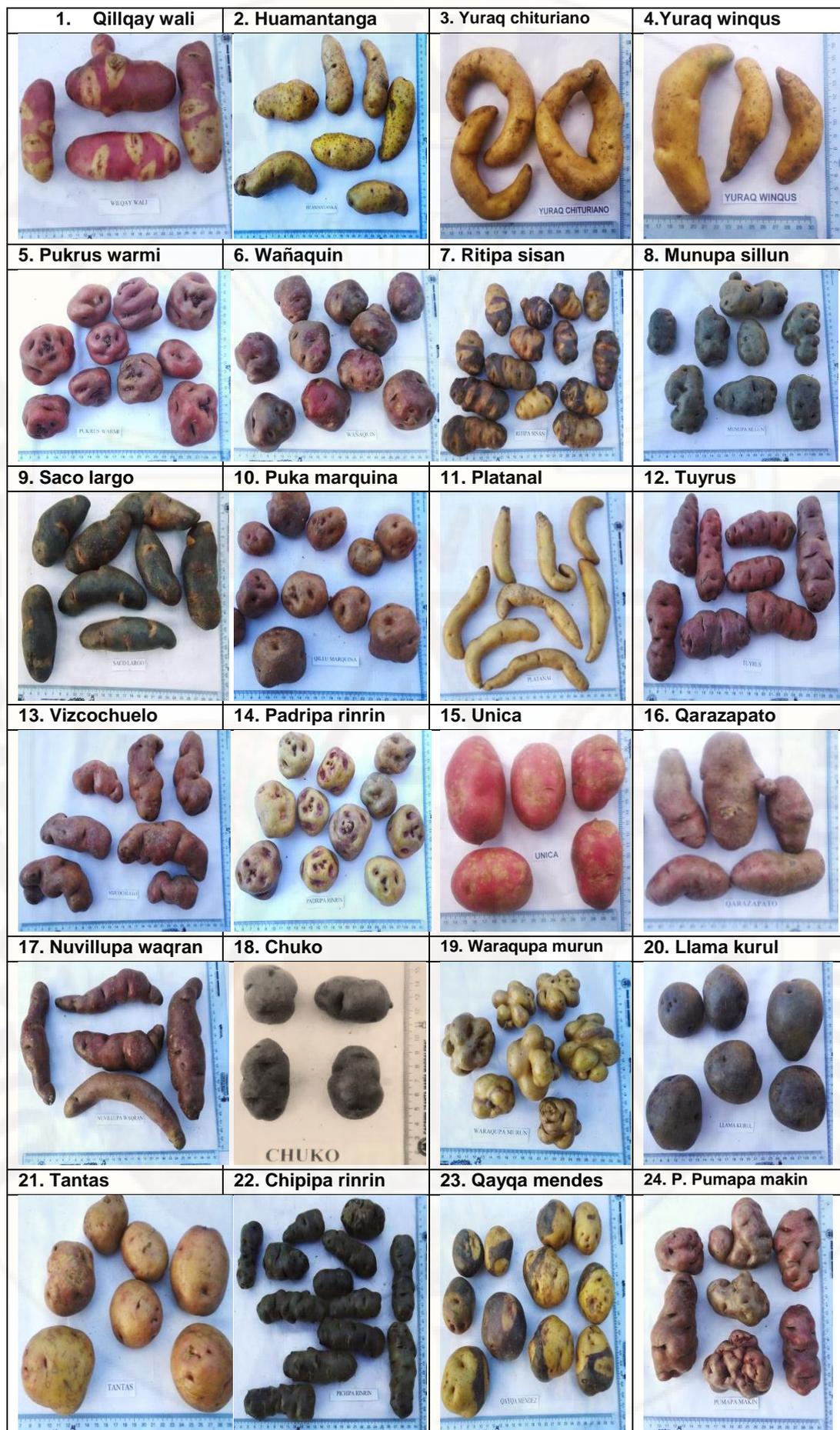
Puntos de muestreo	Coordenadas UTM	Altitud msnm
TP1	13°7'31.98"S 74°28'44.50"O	3930
TP2	13° 9'22.32"S 74°29'11.23"O	4078
TP3	13° 8'21.84"S 74°29'38.98"O	4153
TP4	13° 9'32.22"S 74°30'6.04"O	4185

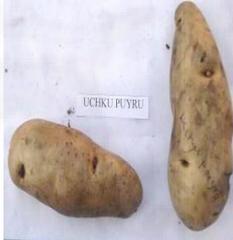
Tabla 6. Relación de accesiones de papas (*Solanum spp.*) colectados en los distritos de Seclla para análisis microsatélites.

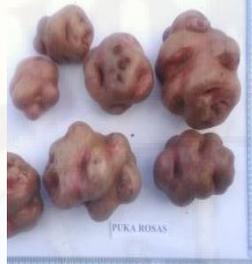
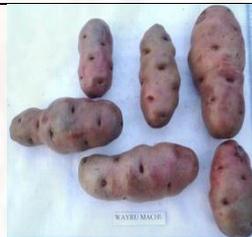
Accesiones de <i>Solanum spp.</i> "papa" de Seclla					
90. Puka chituriano SE1	91. Clavelina SE1	92. Aquy suytu SE1	93. Peruanita SE1	94. Tarwina SE1	95.- Camotillo SE1
96. Challwa SE1	97. Amarilis SE1	98. Yana waña SE1	99. Uqi Marquina SE1	100. Puka imilla SE1	101. Larga SE1
102. Yana waqra SE1	103. Yuraq suytu SE1	104. Amarilla SE2	105. Tumbay SE2	106. Yanamuru winqus SE2	107. Qulluq SE2
108. Sakanpaya SE3	109. Araqcha SE3	110.- Allqupa yupin SE3	111. Ritipa sisan SE3	112.- Yuraq wira pasña SE3	113. Puka muru wira pasña SE3
114. Misipa rinrin SE3	115. Chiqchi papa SE3	116. Pukrus SE3	117. Yuraq siri waña SE3	118. Yana siri waña SE3	119. Kapkas SE3
120. Qatun huayro SE3	121. Toropa waqran SE4	120. Yana huayro SE4	123.- Yana warmicha SE4	124. Chaulao SE4	125. Qaripa runtun SE4
126. Waña SE4	127. Araq papa SE4	128. Puka ara q SE4			

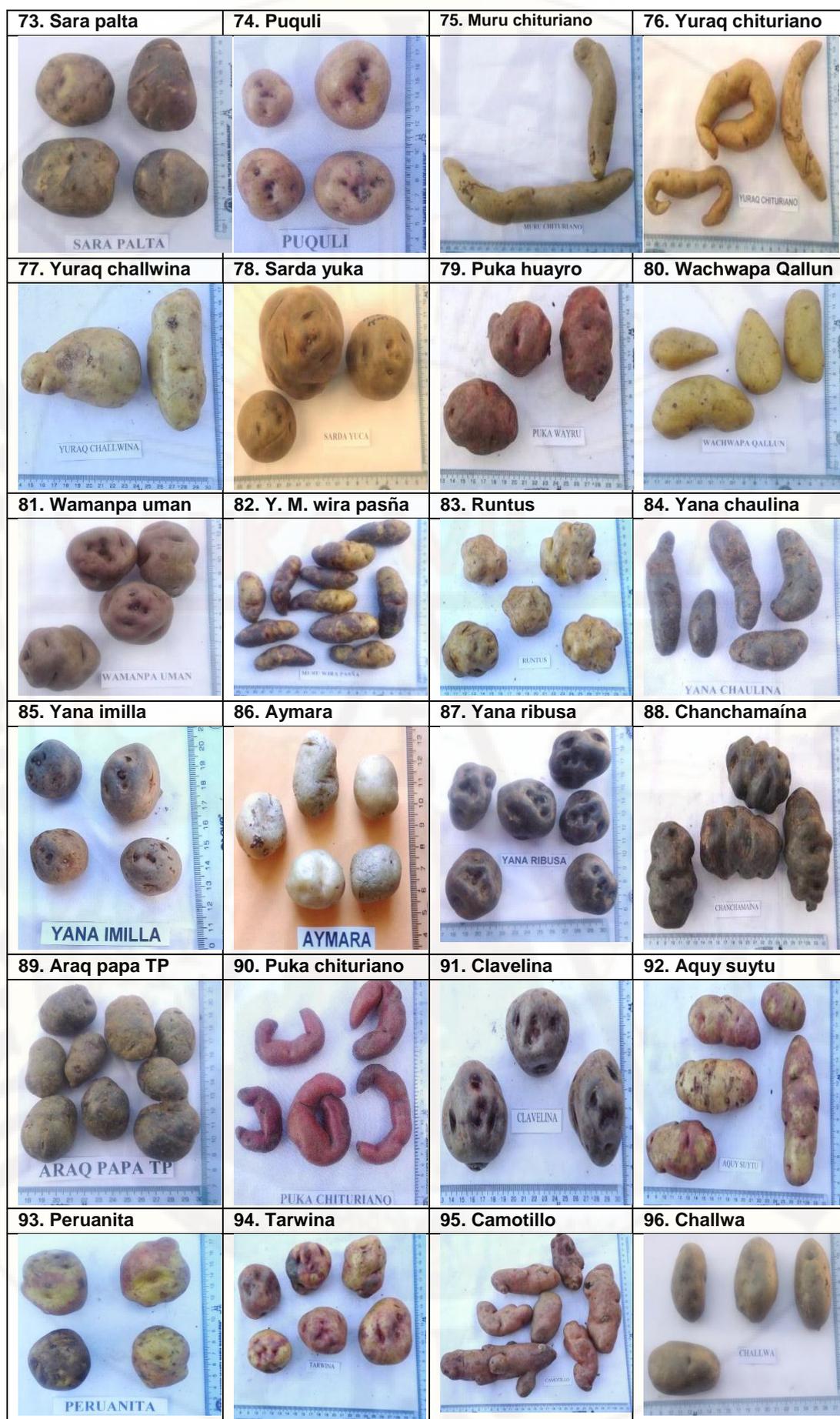
Tabla 7. Puntos de muestreo con coordenadas UTM y altitud según Google Earth de Seclla

Puntos de muestreo	Coordenadas UTM	Altitud msnm
SE1	13°3'17.52"S 74°31'17.31"O	3887
SE2	13°2'31.04"S 74°31'2.77"O	3882
SE3	13°1'57.72"S 74°31'32.05"O	3955
SE4	13°1'27.56"S 74°31'1.24"O	3935



<p>25. Pallay chunchu</p>  <p>PALLAYCHUNCHU</p>	<p>26. Quti papa</p>  <p>QUTI PAPA</p>	<p>27. Huayro macho</p>  <p>WAYRU MACHU</p>	<p>28. Chontapa murun</p>  <p>CHONTAPAMURUN</p>
<p>29. Wira pasña</p>  <p>WIRAPASÑA</p>	<p>30. Qumpis</p>  <p>QUMPI</p>	<p>31. Kuchipa akan</p>  <p>KUCHIPA AKAN</p>	<p>32. Guinda ribusa</p>  <p>GUINDA RIBUSA</p>
<p>33. Yana pumapa makin</p>  <p>YANA PUMAPA MAKIN</p>	<p>34. Muru huayro</p>  <p>MURU WAYRU</p>	<p>35. Puka wali</p>  <p>PUKA WALI</p>	<p>36. Yana huayro</p>  <p>YANA WAYRU</p>
<p>37. Muru wañaquin</p>  <p>MURU WAÑAQIN</p>	<p>38. Puka wañaquin</p>  <p>PUKA WAÑAQIN</p>	<p>39. Yuraq sisa</p>  <p>YURAQ SISA</p>	<p>40. Uchku puyru</p>  <p>UCHKU PUYRU</p>
<p>41. Yana palta waña</p>  <p>YANA PALTA WAÑA</p>	<p>42. Puka challwina</p>  <p>PUKA CHALLWINA</p>	<p>43. Chaulina</p>  <p>CHAULINA</p>	<p>44. Peruanita</p>  <p>PERUANITA</p>
<p>45. Pukia</p>  <p>PUKIA</p>	<p>46. Yungay</p>  <p>YUNGAY</p>	<p>47. Canchan</p>  <p>CANCHAN</p>	<p>48. Mariva</p>  <p>MARIVA</p>

<p>49. Araq papa SA</p>  <p>ARAQ PAPA SA</p>	<p>50. Puka rosas</p>  <p>PUKA ROSAS</p>	<p>51. Yana rosas</p>  <p>YANA ROSAS</p>	<p>52. Yana muru rosas</p>  <p>YANA MURU ROSAS</p>
<p>53. Yuraq rosas</p>  <p>YURAQ ROSAS</p>	<p>54. Allqa rosas</p>  <p>ALLQA ROSAS</p>	<p>55. Sirina</p>  <p>SIRINA</p>	<p>56. Uqi chiqchi pasña</p>  <p>UQI CHIQQCHI PASÑA</p>
<p>57. Muru chaulina</p>  <p>MURU CHAULINA</p>	<p>58. Lenguas</p>  <p>LENGUAS</p>	<p>59. Cusqueña</p>  <p>CUSQUEÑA</p>	<p>60. Yuraq palta waña</p>  <p>YURAQ PALTA WAÑA</p>
<p>61. Bomba</p>  <p>BOMBA</p>	<p>62. Macho huayro</p>  <p>MACHO HUAYRO</p>	<p>63. P. Muru winqus</p>  <p>PUKA MURU WINQUS</p>	<p>64. Qillu azul sunqu</p>  <p>QILLU AZUL SUNQU</p>
<p>65. Qaragallo</p>  <p>QARAGALLO</p>	<p>66. Punkina</p>  <p>PUNQUINA</p>	<p>67. Quwipa sullun</p>  <p>QUWIPA SULLUN</p>	<p>68. Alcarraz</p>  <p>ALCARRAZ</p>
<p>69. Muru pillpintu</p>  <p>MURU PILLPINTU</p>	<p>70. Huancaína</p>  <p>HUANCAÍNA</p>	<p>71. Puka pinya</p>  <p>PUKA PINYA</p>	<p>72. Yana gaspar</p>  <p>YANA GASPAR</p>



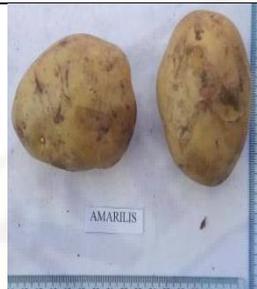
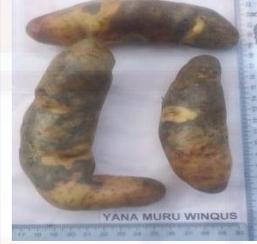
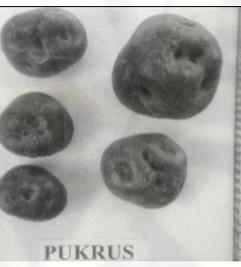
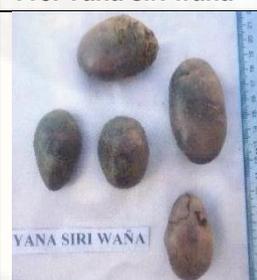
<p>97. Amarilis</p> 	<p>98. Yana waña</p> 	<p>99. Uqi marquina</p> 	<p>100. Puka imilla</p> 
<p>101. Larga</p> 	<p>102. Yana waqra</p> 	<p>103. Yuraq suytu</p> 	<p>104. Amarilla</p> 
<p>105. Tumbay</p> 	<p>106. Y. M. Winqus</p> 	<p>107. Qulluq</p> 	<p>108. Sakanpaya</p> 
<p>109. Araqcha</p> 	<p>110. Allqupa yupin</p> 	<p>111. Ritipa sisan</p> 	<p>112. Yuraq Wira Pasña</p> 
<p>113. Puka M.Wira Pasña</p> 	<p>114. Misipa rinrin</p> 	<p>115. Chiqchi papa</p> 	<p>116. Pukrus</p> 
<p>117. Yuraq siri waña</p> 	<p>118. Yana siri waña</p> 	<p>119. Kapkas</p> 	<p>120. Qatun huayro</p> 



Figura 12. Fotografías de los 128 tubérculos de muestras de papas (*Solanum spp.*) colectados en los distritos de Santillana, Santo de Tomás de Pata y Seclla, para análisis microsatélites.



Figura 13. Tubérculos de papas (*Solanum spp.*) muestreados para el análisis microsatélites sembrados el 18 de julio de 2017 procedentes de Santillana, Seclla y Santo Tomás de Pata.

3.3.2. Siembra

La siembra de 128 accesiones de papa fueron sembrados el 18 de julio de 2017 en bolsas polietileno con dos repeticiones cada accesión en condiciones similares, 49 accesiones fueron colectados en el distrito de Santillana de la provincia de Huanta región Ayacucho, 40 accesiones se recolectaron en el distrito de Santo Tomás de Pata y 39 accesiones se

colectaron en el distrito de Secclla provincia de Angaraes región Huancavelica.

3.3.3. Brotación y crecimiento

La brotación y el crecimiento fueron totalmente diferentes, las accesiones más precoces que brotaron a los trece días después de la siembra fueron: huamantanga, chaulina, huancaína, yuraq challwina, wachwapa qallun, puka chituriano, tumbay y pukrus; mientras los waña y los araq brotaron a los 35 días después de siembra. La mayor parte de las accesiones brotaron a los 33 días después de la siembra. El crecimiento fue totalmente diferente, algunas accesiones que brotaron prontamente tuvieron crecimiento lento y otros que brotaron tardíamente crecieron rápidamente, como se observa en la figura siguiente.



Figura 14. Brotación y crecimiento de las accesiones de papas (*Solanum spp.*) Para el análisis de microsátélites procedentes de Santillana, Secclla y Santo Tomás de Pata.

3.3.4. Colección de muestra

La colección de las muestras para extracción de ADN se realizó el 03 de setiembre de 2017, se muestrearon hojas tiernas y frescas de 128 accesiones de papa, las muestras consistieron de hojas frescas y jóvenes de plantas de las diferentes accesiones. Una vez colectadas las hojas, fueron empaquetadas en papel toallas debidamente rotuladas y conservadas a una temperatura de 4 °C, puestas en una caja de tecnopor para luego ser transportadas al laboratorio de Biología Molecular de la UNSCH,

para realizar la extracción de ADN y posterior análisis de marcadores microsatélites.



Figura 15. Muestreo de hojas tiernas de papas (*Solanum spp.*) para el análisis de microsatélites de *Solanum spp.* “papa” procedentes de Santillana, Secclla y Santo Tomás de Pata.

3.3.5. Extracción del ADN o caracterización molecular

Para la caracterización molecular el material experimental consistió en hojas jóvenes. La extracción del ADN se realizó mediante el método de CTAB (Doyle & Doyle, 1990)⁷¹. Para la extracción del ADN se utilizó los folíolos jóvenes colectados de las papas que fueron molidos en nitrógeno líquido (-170°C) hasta obtener un polvo fino, dando inicio a la extracción del ADN siguiendo el protocolo CTAB, basado en Sambrook⁶⁸, Taylor⁹⁶, Rogers y Bendich⁶⁹.



Figura 16. Extracción del ADN de hojas tiernas de papas (*Solanum spp.*) para el análisis de microsatélites de muestras procedentes de Santillana, Seclla y Santo Tomás de Pata.

El ADN de las muestras de papa se obtuvo de la siguiente manera: Se trituró aproximadamente 100 mg de tejido vegetal de cada accesión de *Solanum spp.* “papa” en un mortero con ayuda de nitrógeno líquido para lograr la ruptura de las paredes y membranas celulares. El polvo obtenido del tejido vegetal triturado se colocó en tubitos Eppendorf (previamente rotulados) colocándose en gradillas agregándose 1,5 ml con 700ul del detergente catiónico para lograr solubilizar las membranas y formar un complejo con el ADN. El buffer CTAB 2X (contenido: 2% CTAB; 1,4 M NaCl; 20 mM EDTA (pH 8); 100 mM Tris HCl (pH 8); 0,2% de β -mercaptoetanol; junto con el CTAB se añadió EDTA para lograr remover los cationes divalentes como el Magnesio y retardar la acción de las enzimas ADNsas, también se agregó el componente β -mercaptoetanol el cual limita la actividad de enzimas ARNsas mediante la apertura de puentes disulfuro, luego se incubó por 30 minutos a 65°C y se centrifugó a 14000 rpm durante 10 minutos, posterior a esto se recuperó el sobrenadante y se agregó 700 μ l de la mezcla cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) para la eliminación de proteínas de la solución con ADN y se centrifugó nuevamente a 14000 rpm por 10 minutos, el sobrenadante, el cual contiene el complejo ADN – CTAB, se transfirió a tubitos eppendorf nuevo al cual se le agregó un volumen 500 μ l de isopropanol helado se mezcló por inversión y luego se colocó la mezcla a

una temperatura de -20°C por aproximadamente 40 minutos con la finalidad de precipitar el ADN.

Pasado ese tiempo se centrifugó a 14000 rpm por 10 minutos para después desechar la fase acuosa. Se lavó y se centrifugó el pellet de ADN sucesivamente con etanol al 70% y 95%. Se dejó secar al aire libre toda la noche y luego se resuspendió en 80 μl de solución de $T_{10}E_1$ buffer (Tris (hidroximetil) aminoetanol 10mM y EDTA 1mM). Se agregó la enzima RNAsa y se incubó por un periodo de 12 horas a una temperatura de 37°C , finalmente las muestras se almacenaron a 4°C .

3.3.6. Determinación de la calidad y concentración de ADN

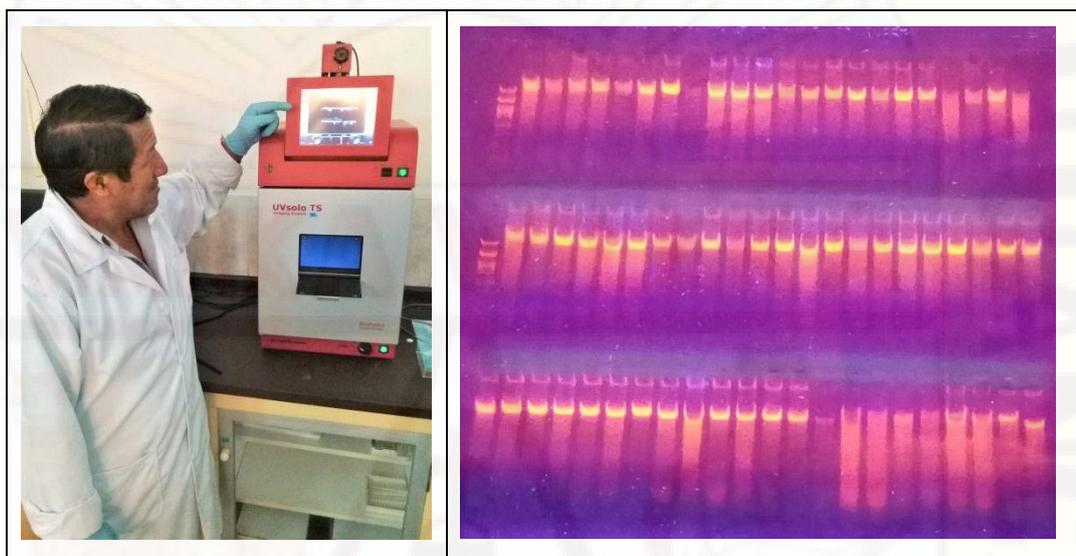


Figura 17. Lectura de la calidad y concentración de ADN de papas (*Solanum spp.*) para el análisis de microsatélites procedentes de Santillana, Santo Tomás de Pata y Secclla

La determinación de la calidad y la concentración del ADN extraído se realizó mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa al 1% (p/v) en buffer TBE 1X, se cargó 2 μl de ADN de cada muestra con 8 μl de SALB 1X y se sometió a una electroforesis a 90V por 60 minutos, para la cuantificación de la concentración de las bandas de ADN se utilizó un marcador de peso molecular que en este caso fue el Fago Lambda cortado con la enzima PstI (*Providencia stuartii*) el cual migra dentro del gel y permite comparar las bandas obtenidas de cada una de las muestras con las distintas bandas que produce el marcador, cuya primera banda mide 14800 pares de bases y su intensidad corresponde a una concentración de 280ng/ μl .

Este método de determinación de la concentración del ADN se basa en comparar el grosor y la intensidad de la banda que se produce a través de la fluorescencia producida por el complejo Bromuro de Etidio-ADN y visualizada mediante el uso de luz ultravioleta. El bromuro de etidio se intercala entre las bases apiladas del ADN y cada banda revela la

presencia de una población de moléculas de ADN que poseen un tamaño específico. Para posteriormente ser visualizados en el foto documentador UVsolo TS imaging system.

Se estimó que una adecuada calidad e integridad del ADN genómico correspondía a bandas de ADN sin degradación. Posteriormente se realizó una dilución del ADN de cada accesión hasta alcanzar una concentración final de 50 ng/μl, conocido como muestra madre, concentración con la que se trabajó en las siguientes etapas. Mediante este método se obtuvieron ADN de buena calidad y concentración, que se observa en la figura siguiente.

3.3.7. Cuantificación de ADN

Inmediatamente concluida el procedimiento anterior se pasó a cuantificar la concentración de ADN total utilizando un espectrofotómetro NANODROP (ND-1000), realizando lecturas de absorbancias a 260 y 280 nm para evaluar la pureza del ADN. Conocida la concentración de ADN, se realizaron las diluciones con agua libre de nucleasas, hasta alcanzar una concentración final de 5 ng/μl de ADN. Estas diluciones fueron almacenadas en una caja de dilución de 96 pozos, a una temperatura de -20°C.

3.3.8. Selección de Primers microsatélites

Antes de iniciar con el PCR se realizó una gradiente de temperatura de 48 – 60°C, cada primer fue probado a cinco temperaturas diferentes de anillamiento (annealing) para cada primer microsatélite de acuerdo a las accesiones de papa, verificando el tamaño esperado (pb) en los productos microsatelitales amplificados. En base a la calidad de los productos de amplificación obtenidos, se efectuó la selección de 8 primers microsatélites para utilizar con las todas accesiones, los primers seleccionados se detalla a continuación.

Tabla 8. Marcadores microsatélites utilizados en la evaluación de papas (*Solanum spp.*) proveniente de distrito de Santillana, Seclla y Santo Tomás de Pata.

Microsatélite	Motivo repetido		Secuencia de iniciador	Cromosoma	T°C	Fuente
STG 0001	(CT) _n	F	AGCCAACATTTGTACCCCT	XI	58	Ghislain et al., 2009
		R	ACCCCCACTTGCCATATTTT		52	
STI 0012	(ATT) _n	F	GAAGCGACTTCCAAAATCAGA	IV	56	Feingold et al., 2005
		R	AAAGGGAGGAATAGAAACCAAAA		55	
STG 0016	(AGA) _n	F	AGCTGCTCAGCATCAAGAGA	I	55	Ghislain et al., 2004
		R	ACCACCTCAGGCACTTCATC		53	
STI 0032	(GGA) _{nr}	F	TGGGAAGAATCCTGAAATGG	V	61	Feingold et al., 2005
		R	TGCTCTACCAATTAACGGCA		60	
STM 0037	(TC) _n (AC) _n AA...(AC) _n (AT) _n	F	AATTTAACTTAGAAGATTAGTCTC	XI	52	Milbourne et al., 1998
		R	ATTTGGTTGGGTATGATA		53	
STM-1052	(AT) _n GT(AT) _n (GT) _n	F	CAATTTCTTTTTTTCATGTGACAC	IX	50	Milbourne et al., 1998
		R	ATGGCGTAATTTGATTTAATACGTAA		52	
STM 1106	(ATT) _n	F	CAAAGTGGTGTGAAGCTGTGA	X	57	Milbourne et al., 1998
		R	TCCAGCTGATTGGTTAGGTTG		51	
STM 5127	(TCT) _n	F	TTCAAGAATAGGCAAAACCA	I	55	Ghislain et al., 2009
		R	CTTTTTCTGACTGAGTTGCCTC		60	

Fuente: Ghislain et al., (2009)¹¹⁸.

3.3.9. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Los reactivos de la tabla adjunta fueron mezclados en tubos eppendorf de 0.2 mL., la reacción se llevó a cabo en un termociclador eppendorf. El programa de PCR utilizado consistió en una fase de desnaturalización inicial a 94°C durante 3 minutos, 30 ciclos de amplificación y una fase de elongación final de 5 minutos a 72°C. Cada ciclo consistió de tres partes: desnaturalización a 94°C por 1 minuto, annealing (diferente temperatura para cada par de primers, durante 2 minutos y una fase de elongación a 72°C por 1.5 minutos. Una vez finalizado el programa de PCR, los tubos fueron centrifugados durante 8 segundos para recoger cualquier producto que pudiera haber quedado en las paredes de los tubos, estos fueron guardados a -20°C.

Tabla 9. Reactivos para la amplificación por PCR de SSR

Reactivo	Concentración	Volúmenes
Buffer para PCR	10X	1.0 uL
MgCl ₂	50 mM	0.3 uL
dNTPs (100mM c/u)	20mM	0.1 uL
Primer	10 uM	0.4 uL
Taq (1-2 U por reacción)		0.2 uL
ADN	5 ng/uL	2.0 uL
Agua		6.0 uL
Total		10.0 uL

3.3.10. Electroforesis en geles de poliacrilamida

Se preparó 100 mL de solución de poliacrilamida al 6% (acrilamida, bis-acrilamida, 19:1), urea 5 M. Se agregó 545 uL de persulfato de amonio al 10% y 109 uL de TEMED. La solución se colocó entre los vidrios de la cámara. Siendo el tamaño del gel 28 x 40 cm, y su grosor 0.4 mm. Previamente al cargado de las muestras, el gel es pre-corrido en una fuente de poder a 85 W durante 30 minutos, luego se limpió con toda delicadeza los pocillos con una jeringa hipodérmica, las muestras se cargan con un tip de punta fina, se coge 6 uL de muestra y en orden se coloca en cada pocillo para ser separados en geles de poliacrilamida al 6%, corridos en una cámara vertical de electroforesis de secuenciamiento, usando como gradiente de corrida TBE 1X y 0.5X, para el ánodo y cátodo respectivamente.

3.3.11. Fijación, tinción y revelado de gel

Fijación

Se realizó siguiendo el protocolo desarrollado por Benbouza et al. (2006)¹⁰⁸. Después de terminar la electroforesis, el vidrio que contiene el gel (vidrio Adherente) se sumergió en una solución de etanol al 10% y ácido acético al 0.5% durante 5 minutos, para el proceso de fijación.

Tinción

Se sumergió el vidrio con el gel en una solución de nitrato de plata (1.5 g/L), a la que se añadió 1.5 mL de formaldehído al 37% por litro de solución. La tinción se llevó a cabo en la oscuridad, durante 6-7 minutos agitándose constantemente. Después se traspasó el vidrio con el gel a otra bandeja para sumergir en agua destilada por 15 segundos.

El nitrato de plata actúa como agente impregnante en medios débilmente ácidos y reacciona con los nucleótidos (adenina, citosina, guanina y timina), el formaldehído es agente reductor de plata en condiciones alcalinas. La plata se reduce a tasas muy bajas; lo cual produce sitios de nucleación inicial alrededor del sustrato de tinción (caetano, 1994, mencionado por Alvarado)⁹⁷ y durante el revelado en estos sitios favorecen la acumulación de plata reducida.

Revelado

Luego se reveló el vidrio adherente usando una solución de hidróxido de sodio (15 g/L), con 2 mL de formaldehído al 37% por litro de solución, en un medio básico (pH= 12). El revelado se realizó en la oscuridad agitándose hasta observar las bandas en el vidrio con gel. Para evitar que el gel se sobreexpusiera se sumergió en la misma solución fijadora durante dos minutos.

La metodología está basada en la reducción del nitrato de plata por el formaldehído, en un medio de Ag^+ son reducidos a plata metálica (Ag^0) solamente en la presencia de una biomolécula, como ADN, formando un complejo visible las bandas. Los resultados fueron observados y luego reportados con la ayuda de un transiluminador de luz blanca, que se observa en la figura 5. Los procedimientos se resumen en la tabla 4.

Tabla 10. Protocolo de fijación, tinción y revelado de geles de poliacrilamida

Paso	Solución	Tiempo	Observaciones
Fijación	Etanol absoluto al 10%, ácido acético al 0.5%	5 minutos	10 usos
Tinción	Nitrato de plata (1.5 g/L) formaldehído 37% (1.5 mL/L)	6-7 minutos	En oscuridad agitación constante
Lavado	Agua destilada	15 seg	
Revelado	Hidróxido de sodio (15 g/L), formaldehído 37% (2mL/L)	3-5 minutos	Realizar en la oscuridad 4 usos
Para cada	Solución de fijación	2 minutos	

Fuente: Peñafiel¹⁰⁹.

3.3.12. Lectura de alelos de SSR



Figura 18. Bandas de ADN obtenido después del revelado

Las bandas reveladas como resultado del proceso de tinción fueron registradas visualmente con ayuda de un transiluminador de luz blanca, se leyeron las bandas con mejor resolución y se enumeraron consecutivamente empezando desde la primera accesión del primer carril, cada banda de ADN fue considerada como un locus individual. Las bandas, se numeraron en orden ascendente, tomando como referencia su respectivo peso molecular, y se codificaron en una matriz binaria donde “1” indicó presencia y “0” ausencia. Se consideró que todos los marcadores obtenidos constituyen una muestra representativa y al azar de todo el genoma de las accesiones de papa. Cada locus de SSR se caracterizaron según la nitidez de sus bandas, ancho o amplitud de sus alelos y presencia de sombras, definiéndose un índice de calidad de lectura para cada marcador SSR de acuerdo a la metodología consensuada en el Taller de análisis SSR en papa y desarrollo de bases de datos, realizado en el Centro Internacional de la Papa (CIP, 2004)^{98,114}.

Tabla 11. Ejemplo de matriz binaria de datos con la presencia/ausencia de los alelos de STG-0001 con diez bandas de las 10 primeras accesiones de papas (*Solanum spp.*) procedente del distrito de Santillana

STG-0001	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Locus 1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Locus 2	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
Locus 3	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0
Locus 4	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Locus 5	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1
Locus 6	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1
Locus 7	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
Locus 8	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0
Locus 9	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0
Locus 10	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0

3.4. Diseño de investigación

De acuerdo a las variables, las hipótesis planteadas, población y muestra, el estudio pertenece al diseño no experimental, transversal descriptivo.

La diversidad genética dentro y entre poblaciones está dada por la variación en loci específicos de marcadores genéticos entre muestras e individuos es expresada como polimorfismo⁶⁶. Un marcador genético es una variante alélica que es usada para diferenciar o marcar una estructura biológica o proceso a través del curso de un experimento⁹⁹. La comparación de mapas genéticos es una herramienta poderosa para conseguir información genética acerca de organismos relacionados, para inferir relaciones filogenéticas¹⁹. La papa (*Solanum spp.*), es importante para la seguridad alimentaria, el registro de variedades de papa usando marcadores moleculares es una actividad reciente e importante para el monitoreo, la protección y el estudio de la diversidad genética de los recursos genéticos. El *Solanum spp.*, es un recurso de mucho valor económico y social para los campesinos conservacionistas que continuamente utilizan esta diversidad. Por esta razón, es esencial estudiar la diversidad y las relaciones genéticas de la papa, manejadas y conservadas, algunas variedades de papa son susceptibles a plagas y enfermedades los mismos servirán para el mejoramiento genético⁶⁶. Los marcadores moleculares basados en Secuencias Simples Repetidas (SSR) constituyen una herramienta altamente eficaz para la identificación de genotipos de papa y pueden ser de gran utilidad en la conservación y manejo de germoplasma²⁶.

La variable independiente diversidad de papas y las variables dependientes como perfil molecular, variabilidad y distancia genética de marcadores moleculares microsatélite están estrechamente relacionadas con las pruebas de hipótesis, que a través de procesamientos estadísticos

se podrán estimar las frecuencias genéticas y genotípicas, donde se analizarán la variabilidad dentro de poblaciones y la variabilidad entre poblaciones estimando el índice polimórfico y heterocigosidad, donde se comparará filogenéticamente la diversidad genética mediante dendrogramas de las papas muestreadas en los distritos de Seclla y Santo Tomás de Pata de la región Huancavelica y distrito de Santillana de la región Ayacucho.

3.5. Población, muestra y muestreo

- La población en estudio estuvo comprendida por la diversidad de papas cultivadas nativas, mejoradas y semisilvestres existentes en los distritos de Santillana, Santo Tomás de Pata y Seclla.
- El tamaño de la muestra es de 128, 49 accesiones provienen de Santillana, 40 accesiones provienen de Santo Tomás de Pata, 39 accesiones provienen de Seclla.
- El tipo de muestreo fue el no probabilístico, es decir que los tubérculos serán elegidos por el investigador.

3.6. Técnicas e instrumentos de recolección de datos

Variable	Técnica	Instrumento
Perfil molecular microsatélite	Reacción en columna de la polimerasa (PCR) de los microsatélites en ADN.	<ul style="list-style-type: none"> • Primers para cada microsatélite. • Kit de ADN polimerasa. • Gel de poliacrilamida. • Termociclador. • Analizador de ADN (Li-Cor).
Variabilidad de marcadores moleculares microsatélite	<ul style="list-style-type: none"> • Presencia o ausencia de bandas de ADN. • Índice de variabilidad. • Grado de heterocigosidad. 	<ul style="list-style-type: none"> • Electroforesis. • Registro fotográfico. • Software para determinar variabilidad. • Computadora personal
Distancia genética de marcadores moleculares microsatélite	<ul style="list-style-type: none"> • Coeficiente de similitud en microsatélites en distintas partes de ADN. • Análisis de agrupamiento. • Algoritmos de distancia. • Método de UPGMA. • Coordenadas principales. 	<ul style="list-style-type: none"> • Software con programa Darwin. • Computadora personal.

3.7. Técnicas de procesamiento y análisis de datos

Los datos se analizaron con los paquetes estadísticos de con coeficiente Simple matching, con NTSYS 2.10p. El dendrograma de relaciones entre las variedades se construyó usando coeficientes de similitud de Jaccard (1908) y el método de agrupamiento UPGMA (Unweighted Pair Group Method using Arithmetic Averages). Para estimar parámetros de polimorfismo a nivel de poblaciones con la matriz de datos de presencia/ausencia se usó el programa POPGEN32. Los parámetros genéticos evaluados al nivel de poblaciones fueron el porcentaje de loci polimórficos (%P), el índice de Shannon (I), distancia e identidad genética de Nei (1978) (H) y heterocigosidad esperada (H_e)^{99, 100, 113}.

UPGMA, es un método basado en distancias genéticas, la distancia se expresa como la fracción de sitios que difieren entre dos secuencias en un apareamiento múltiple. Así que, la suposición que a mayor tiempo transcurrido de divergencia a partir de un ancestro común, más diferirán las secuencias es razonable, pero no siempre es verdadera. El método UPGMA así como el método de Neighbor Joining (NJ) generan una matriz de distancia, calculado para cada par de taxa la distancia, o la fracción de distancias entre dos secuencias¹¹⁷.

3.7.1. Procesamiento y análisis de los resultados

1. Medidas descriptivas

Con la información de bandas, se determinó las frecuencias de presencias (P), división de la cantidad de fragmentos amplificados (1) entre el total de individuos, la frecuencia de ausencias (Q) se obtuvo restando 1 menos el valor de P . Los loci con frecuencia de presencia P menores a 0.05 se consideraron raros. Los loci con una frecuencia de presencia P igual a 1.0 fueron considerados monomórficos. Asumiendo el equilibrio de Hardy – Weinberg se calcularon las frecuencias alélicas de presencia (p) y ausencia (q), en la que $q = \sqrt{Q}$ y $p = 1 - q$. Se contaron con las medidas: riqueza de alelos (PIC), para este caso se calculó el PIC para cada locus con la siguiente fórmula (Ghislain et al, 1999)¹⁷:

$$PIC = 1 - p^2 - q^2$$

p : frecuencia alélica de presencia

q : frecuencia alélica de ausencia

Luego, se promediaron todos los valores PIC para cada *Cebador*, generando sus respectivos PIC promedio.

2. Análisis multivariado

Se realizó un análisis multivariado de 128 OTUs (individuos = accesiones) y 74 loci (caracteres), ordenados en una “matriz básica”, siendo las filas las OTUs y las columnas los loci. Se utilizó el software estadístico NTSYS

v2.1p (Rohlf, 2000)¹⁶⁹. Mediante este software se realizaron dos análisis: agrupamiento por UPGMA y ordenación mediante Análisis de Coordenadas Principales (PcoA, *Principal Coordinate Analysis*).

Se calculó la similitud entre cada par de genotipos para calcular la diversidad basada en diferencias cualitativas. Se construyó de una “Matriz de Similitud”. Para obtener la matriz de similitud se utilizó el coeficiente de *Jaccard* (Crisci y López, 1983¹³⁰; Rohlf, 2000¹⁶⁹).

		OTUj	
		1	0
OTUi	1	a	b
	0	c	d

$$Jaccard = \frac{a_{(11)}}{a_{(11)} + b_{(10)} + c_{(01)}}$$

En el software NTSYSpc v2.1p, los comandos que se ejecutaron para los análisis descritos anteriormente se escribieron en un *batch file* o “archivo lote”. (Rohlf, 2000)¹⁶⁹.

3.- Análisis poblacional

Se estudió la diversidad genética por medio de una comparación entre poblaciones. Se usaron los softwares genéticos: Arlequin v3.1 (Excoffier *et al.*, 2005)¹³¹ y POPGENE v1.32 (Yeh *et al.*, 1999)¹³².

Para lograr el cálculo de los parámetros, se supuso que la población está en un equilibrio Hardy –Weinberg. Mediante POPGENE v1.32 se estimaron los siguientes parámetros:

- Loci polimórficos para población, subpoblación y todos los individuos.
- Índice de Información de Shannon como medida de la diversidad genética:

$$I = \sum_{i=1}^n p_i^2 \text{Log}_2 p_i$$

- Diversidad genética de Nei, conocida como Heterocigocidad esperada (H_e) y es la probabilidad de que cualquier par de alelos (en un único locus) escogidos al azar de la población sean diferentes entre sí (De Vicente *et al.*, 2004)¹²¹.

$$H_e = \frac{\sum_{j=1}^n H_j}{n} = \frac{\sum_{j=1}^n (1 - \sum_{i=1}^m p_{ij}^2)}{n}$$

H_j : Heterocigosidad esperada en un locus j , o índice de diversidad de Nei de un locus j

p_{ij} : Frecuencia del alelo i del locus j

m : número de alelos en el locus j

n : número de loci considerado

- Parámetro G_{st} entre poblaciones y entre pares de subpoblaciones.
- Matriz de Distancias e Identidades Genéticas normalizadas (*unbiased*) de Nei (1978)⁹⁹, (Yeh, *et al*, 1999)¹³².

Se cuantificó la variación presente entre las poblaciones, mediante el AMOVA (Análisis Molecular de Variancia), usando el programa Arlequin v3.1 con la opción “*pairwise differences*” (diferencias por parejas). En este software, los datos moleculares binarios se consignaron como locus. El coeficiente de diferenciación genética (F_{ST}) cuantifica la diferenciación u homogenización entre distintas poblaciones.

3.8. Puntos de corte en dendrogramas

Las accesiones se comportan y se agrupan de la misma manera que con la distancia taxonómica media, por lo que en el dendrograma se establecerán las mismas líneas de corte; pero las OTU que componen esos grupos son los mismos que dicha distancia, para realizar buenas interpretaciones a los cluster formados, la altura de corte debe ser la más ponderada con la finalidad de encontrar buena información. Si fuera necesario puede haber dos alturas de corte, esta distancia se toma en cuenta con la variabilidad de los caracteres, lo que da una mayor confiabilidad en el agrupamiento, debido a que esta distancia resalta aquellas variables que tengan una mayor variabilidad para la formación de grupos, por lo que para saber cuales son más importantes para el estudio de caracterización⁸².

3.9. Descripción de la prueba de hipótesis

Para la determinación de la prueba de hipótesis, se realizó de acuerdo a las hipótesis planteadas en el proyecto, se realizó procesamientos estadísticos que consistieron en estimar los perfiles moleculares de la diversidad de papas (*Solanum spp.*), variabilidad y distancias genéticas de los marcadores moleculares. Para los perfiles moleculares se calculó los valores del índice de contenido polimórfico (PIC) e índice de combinación de 8 pares de iniciadores microsatélites. El análisis de variabilidad se estimó a través del índice polimórfico, promedio y desviación estándar del índice de información de Shannon's y heterocigosidad esperada. Las distancias genéticas se estimaron a través de los cálculos de distancia e identidad genética de Nei (1978)⁹⁹. El

análisis filogenético y de diversidad genética se realizaron mediante dendrogramas UPGMA basados en distancias genéticas. La prueba de hipótesis se realizó utilizando el análisis de varianza molecular (AMOVA, por sus siglas en inglés Analysis of Molecular Variance)^{101, 102, 113}.

El estadístico F_{ST} es una cantidad medible de la variación genética que es atribuible al agrupamiento de muestras en las subpoblaciones; por ejemplo, un valor de 0,05 significa que 5 por ciento de la variación genética observada se debe a la existencia de subpoblaciones y que el otro 95 por ciento de la variación observada se debe a la variación genética entre individuos dentro de subpoblaciones¹¹⁷.

Tabla 12. Valores de diferenciación genética entre las poblaciones (F_{ST}) para análisis de AMOVA

$F_{ST} = 0.00$	No hay diferencia genética
0.00 – 0.05	Diferenciación genética pequeña
0.05 – 0.15	Diferenciación genética moderada
0.15 – 0.25	Diferenciación genética alta
$F_{ST} > 0.25$	Diferenciación genética muy alta
$F_{ST} = 1.00$	Diferenciación genética total

Fuente: Hart & Clark, 1997¹²³.

Para calcular las desviaciones de frecuencias genotípicas en poblaciones subdivididas se realizan por medio del tres parámetro F_{ST} ¹²⁵.

- F_{ST} : Mide la diferenciación genética entre poblaciones, va de 0 (todas las poblaciones tienen exactamente las mismas frecuencias alélicas), a 1 (si tienen alelos completamente diferentes).

CAPÍTULO IV

PRESENTACIÓN DE RESULTADOS

4.1. Presentación e interpretación de datos

4.1.1. Perfiles moleculares de la diversidad genética de papa *Solanum spp.*

Tabla 13. Valores del índice de contenido polimórfico (PIC) e índice de combinación de 8 pares de iniciadores microsatélites utilizados en el análisis de diversidad de papas (*Solanum spp.*) procedentes de Secclla, Santo Tomás de Pata y Santillana

Cebadores microsatélites	N° de bandas amplificadas	Índice de contenido polimórfico	Índice de combinación de iniciadores
STG-0001	10	0.287	2.866
STI-0012	9	0.246	2.217
STG-0016	12	0.232	2.782
STI-0032	10	0.231	2.306
STM-0037	9	0.159	1.433
STM-1052	7	0.262	1.833
STM-1106	8	0.222	1.775
STM-5127	9	0.271	2.438
PROMEDIO		0.238	2.206

El PIC (tabla 13) fue calculado para cada iniciador de las 128 accesiones de papa procedentes de los distritos de Santillana, Santo Tomás de Pata y Secclla el valor más alto alcanzó el cebador STG-0001 con 0.287, el menor valor se registró del cebador STM-0037 con un valor de 0.159, con un promedio de 0.238, entonces estos valores varían entre 0.287 a 0.159, el cebador más informativo STG-0001 con un valor de PIC de 0.287, seguido por STM-5127 con un valor de 0.271, STM-1052 con un valor de 0.262, STI-0012 con 0.246, STG-0016 con 0.232, STG-0032 con 0.231,

STM-1106 con 0.222 todas estos iniciadores presentan una ligera variación con respecto al primer cebador indicando que existe polimorfismo, el cebador STM-0037 es el que tiene menor valor del PIC que indica poca posibilidad de detectar el polimorfismo. Estos resultados nos indican que el polimorfismo en estas accesiones es bajo.

El índice de combinación de iniciadores indica que el iniciador STG-0001 para las 128 accesiones de papa, es el más polimórfico, es decir, se encontró los loci más variables, seguido de STG-0016 y el iniciador STM-0037 es el que determina menor polimorfismo.

Tabla 14. Valores de los iniciadores de Secuencia Simple Repetida para 8 pares de iniciadores del índice de combinación de iniciadores y del promedio del PIC por poblaciones

Cebador SSR	SECCLLA		SANTO TOMÁS DE PATA		SANTILLANA	
	Índice de la combinación de iniciadores	Promedio de PIC	Índice de la combinación de iniciadores	Promedio de PIC	Índice de la combinación de iniciadores	Promedio de PIC
	STG-0001	2.460	0.246	2.891	0.289	2.966
STI-0012	2.003	0.223	2.508	0.279	1.715	0.191
STG-0016	2.795	0.233	2.927	0.244	2.363	0.197
STI-0032	1.909	0.191	2.323	0.232	2.495	0.249
STM-0037	1.402	0.156	1.313	0.146	1.188	0.132
STM-1052	1.730	0.247	1.883	0.269	1.821	0.260
STM-1106	1.881	0.235	1.462	0.183	1.867	0.233
STM-5127	2.444	0.272	2.356	0.262	2.267	0.252
PROMEDIO	2.078	0.225	2.208	0.238	2.085	0.226

La tabla 14, muestra que los iniciadores microsatélites pueden mostrar mayor polimorfismo en una población, mientras en otra población mostrar menor polimorfismo porque las muestras son diferentes, pueden ser muestras diploides, triploides, tetraploides, pentaploides, etc., por ejemplo el iniciador STG-0001 para Secclla muestra 2.460, en Santo Tomás de Pata su valor es 2.891 y para Santillana 2.966, el mayor polimorfismo se detecta en la población de Santillana y menor polimorfismo en la población de Secclla. Otro iniciador que determina el polimorfismo es el STG-0016 que en la población de Santo Tomás de Pata existe mayor polimorfismo y el iniciador que determinó menor polimorfismo es iniciador STM-0037 con 0.146. En el promedio del PIC (Polymorphic Information Content), por su sigla en inglés, varía desde 0.132 del cebador STM-0037 siendo el menos informativo hasta el más informativo el iniciador STG-0001 con un valor de 0.297 en ambos casos se trata de las accesiones del distrito de Santillana. En el distrito de Secclla el cebador menos informativo es el STM-0037 con un valor de 0.156 y el más informativo es STM-5127 con un valor de 0.272. El iniciador STM-0037 con 0.146 y STG-0001 con 0.289 son los menos y más informativos

respectivamente del distrito de Santo Tomás de Pata. En consecuencia el cebador STM-5127 para Secclla y STG-0001 en las poblaciones de Santo Tomás de Pata y Santillana son los más informativos y el menos informativo es STM-0037.

4.1.2. Variabilidad de marcadores moleculares microsatélites

Tabla 15. Porcentaje de *loci* polimórfico (%P) del análisis molecular con marcadores microsatélites de papas (*Solanum spp.*) procedentes de Secclla, Santo Tomás de Pata y Santillana

Población	% P
Santillana	97.30
Santo Tomás de Pata	91.89
Secclla	89.19
PROMEDIO	92.79

En la tabla 15, se muestra el porcentaje de *loci* polimórfico de las tres poblaciones estudiadas, cabe destacar que en la población de Santillana se analizaron 49 accesiones de papa, y se amplificaron ADN de 74 *loci*, siendo el porcentaje de *loci* polimórfico 97.30%, lo que evidencia que esta población presenta un número mayor de *loci* variables, como consecuencia de la presencia de un menor porcentaje de *loci* monomórfico (2.7%). En la población de Santo Tomás de Pata se analizaron 40 accesiones de papa, y presentó el 91.89% de *loci* polimórfico. Mientras que la población de Secclla se analizó 39 accesiones con un 89.19 % de *loci* polimórfico, siendo el menos polimórfico. El promedio de *loci* polimórficos de todas las accesiones analizadas (128) fue de 92.79% con una desviación estándar de 2.38%. Las accesiones de Santillana es el más polimórfico, es decir, las papas procedentes de éste distrito son las que cuentan con mayor heterocigosidad.

Tabla 16. Promedio y desviación estándar del Índice de información de Shannon's (I) y Heterocigosidad esperada (He) del análisis molecular con marcadores microsatélites de papas (*Solanum spp.*) procedentes de Secclla, Santo Tomás de Pata y Santillana

Población	N	I	He
Santillana	49	0.358±0.026	0.225±0.020
Santo Tomás de Pata	40	0.373±0.027	0.239±0.020
Secclla	39	0.355±0.027	0.225±0.020
Promedio del total de accesiones	128	0.362±0.015	0.23±0.011

En la tabla 16, se observa el promedio y desviación estándar de información de Shannon's (I) para las 49 accesiones del distrito de Santillana es de 0.358 con una desviación estándar de 0.026 y la heterocigosidad (He) se reporta 0.225 con una desviación estándar de 0.020. Para el distrito de Santo Tomás de Pata la información de Shannon's (I) para los 40 accesiones es de 0.373 con desviación estándar de 0.027 y la heterocigosidad cuyo valor es de 0.239 con desviación estándar de 0.020. Para las 39 muestras de la población del distrito de Secclla la información de Shannon's (I) es de 0.355 con desviación estándar de 0.027, mientras para heterocigosidad 0.225 con desviación estándar de 0.020. El promedio de Índice de información de Shannon's (I) de todas las accesiones analizadas fue de 0.362 con una desviación estándar de 0.015. El promedio de la Heterocigosidad esperada (He) de todas las accesiones analizadas fue de 0.23 con una desviación estándar de 0.011.

4.1.3. Distancias genéticas de marcadores moleculares microsatélites

En la tabla 17 se muestra la relación genética entre las accesiones de papa que conforman las tres poblaciones. Las poblaciones que presentan mayor relación genética comprenden a Santillana y Santo Tomás de Pata siendo la identidad genética de Nei de 0.986 y forman un grupo a una distancia ultramétrica de 0.986 (figura 17), lo cual indica que las accesiones de papa de estas poblaciones presentan mayores características genéticas en común. Las poblaciones de Santo Tomás de Pata y Secclla presentan una identidad genética de Nei de 0.976, valor que no es muy distinto a lo observado entre las poblaciones de Santillana y Secclla cuyo valor de identidad genética es de 0.975. Por lo tanto, se observa que las accesiones de la población de Secclla son más diferentes genéticamente que las accesiones de las poblaciones de Santillana y Santo Tomás de Pata (figura 19).

Tabla 17. Distancia e identidad genética de Nei del análisis de marcadores microsatélites de papas (*Solanum spp.*) procedentes de Santillana, Secclla y Santo Tomás de Pata

Población 1	Población 2	Distancia genética NEI D	Identidad genética Nei I	N° de accesiones población 1	N° de accesiones población 2
Santillana	Santo Tomás de Pata	0.015	0.986	49	40
Santillana	Secclla	0.025	0.975	49	39
Santo Tomás de Pata	Secclla	0.024	0.976	40	39

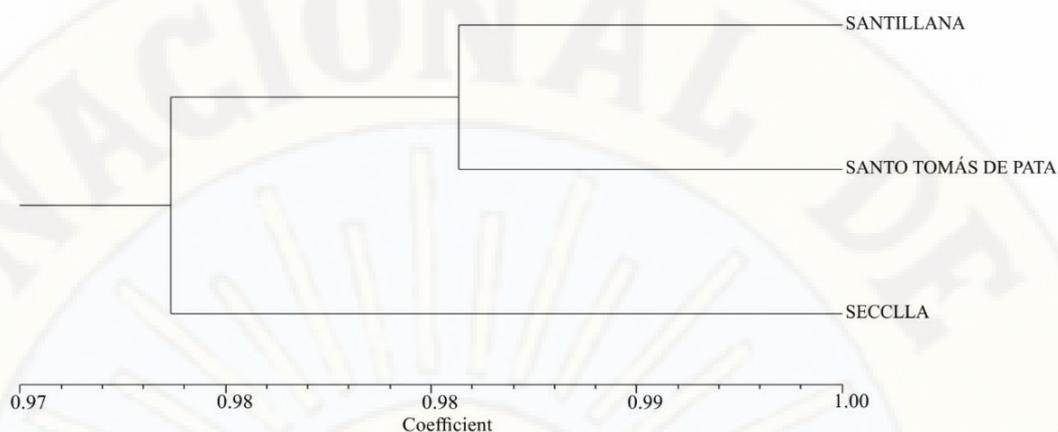


Figura 19: Dendrograma de relación genética entre accesiones de papa de tres poblaciones

Del análisis de agrupamiento del dendrograma de relaciones entre las variedades, se construyó usando coeficiente similitud de Simple Matching y el método de Agrupamiento de UPGMA (Unweighted Pair Group Method using Arithmetic Averages), según las figuras 20 y 21, se puede observar que del análisis de 74 marcadores microsatélites, a un coeficiente de similitud 0.70 unidades ultramétricas se agruparon en once grupos las 128 accesiones de papas (*Solanum spp.*) procedentes de los distritos de Santillana provincia de Huanta región Ayacucho y de los distritos de Santo Tomás de Pata y Secclla de la provincia de Angaraes región Huancavelica. El primer grupo I está formado por 13 accesiones, con 10.16%, que coinciden en los marcadores moleculares, en este grupo de encuentran accesiones qillqay wali, quwipa sullun, lenguas, yana chaulina, muruchaulina, bomba, muru pillpintu, yuraq palta waña, muru chituriano, yuraq chituriano, sarda yuka, yana ribusa y puquli, el primero de los nombrados es procedente del distrito de Santillana y los doce restantes pertenecen al distrito de Santo Tomás de Pata formando un grupo local indicacando que este grupo es similar en muchas características genotípicas. El segundo grupo esta formado 87 accesiones con 67.96%, observándose accesiones de los tres distritos, 42 de Santillana, 21 de Santo Tomás de Pata y 24 de Secclla; muruwañaquin y pukawañaquin pertenecientes a Santillana se trata de una sola accesión, es decir son duplicados; yana rosas e yana muru rosas de Santo Tomás de Pata también son duplicados, de las 128 accesiones existen solo dos duplicados. Es importante señalar que la papa amarilla procedente de Secclla es diferente al runtus de Santo Tomás de Pata, cabe indicar que a estas accesiones en diferentes comunidades campesinas de Ayacucho y Huancavelica se conoce con estos nombres indistintamente, con los resultados obtenidos afirmamos que son diferentes desde el punto de vista de marcadores microsatélites; lo mismo ocurre con ritipa sisan de

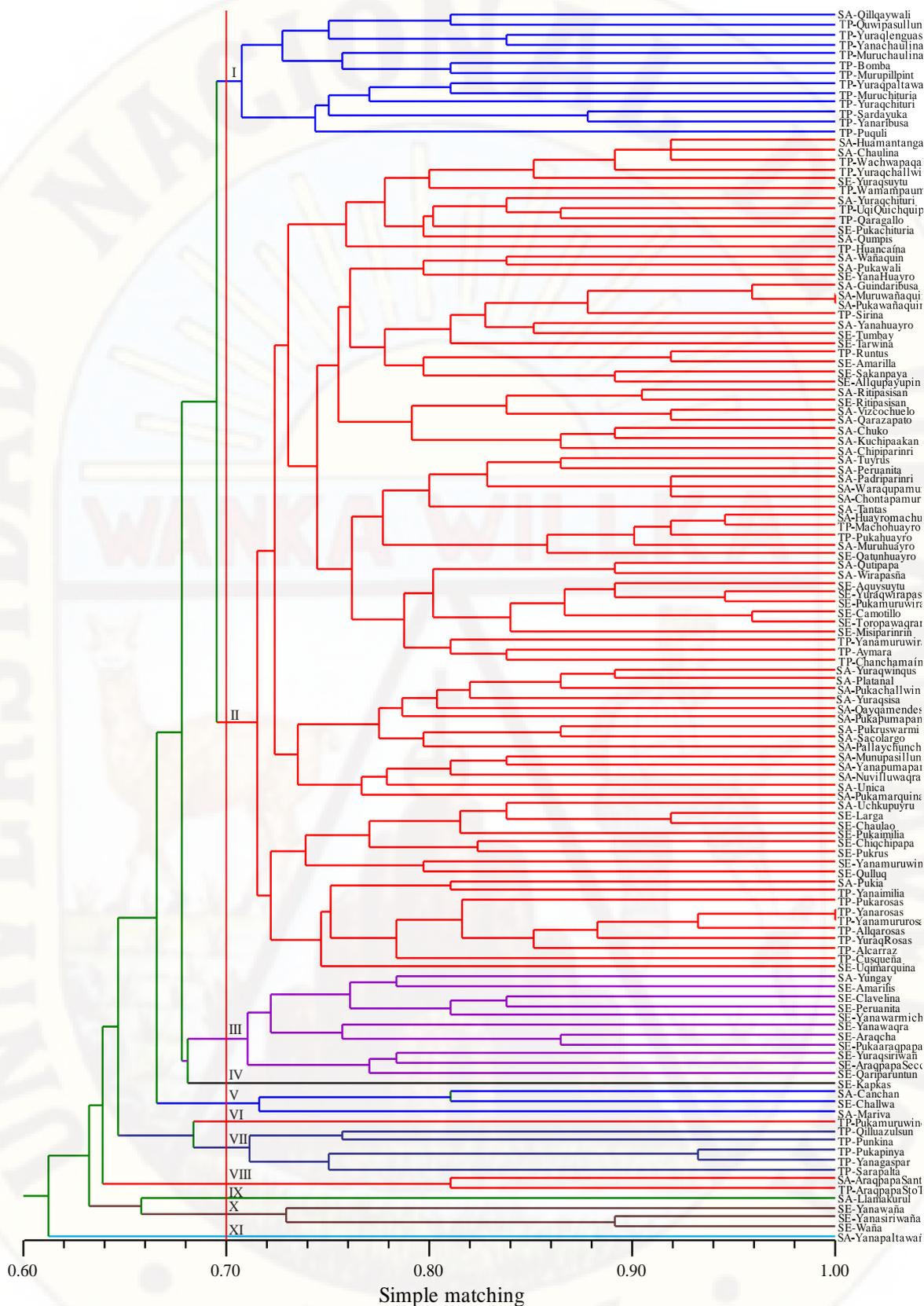


Figura 20. Dendrograma de 128 accesiones de papas (*Solanum spp.*) procedentes de Santillana provincia de Huanta región Ayacucho, Santo Tomás de Pata y Seclla de la provincia de Angaraes región Huancavelica.

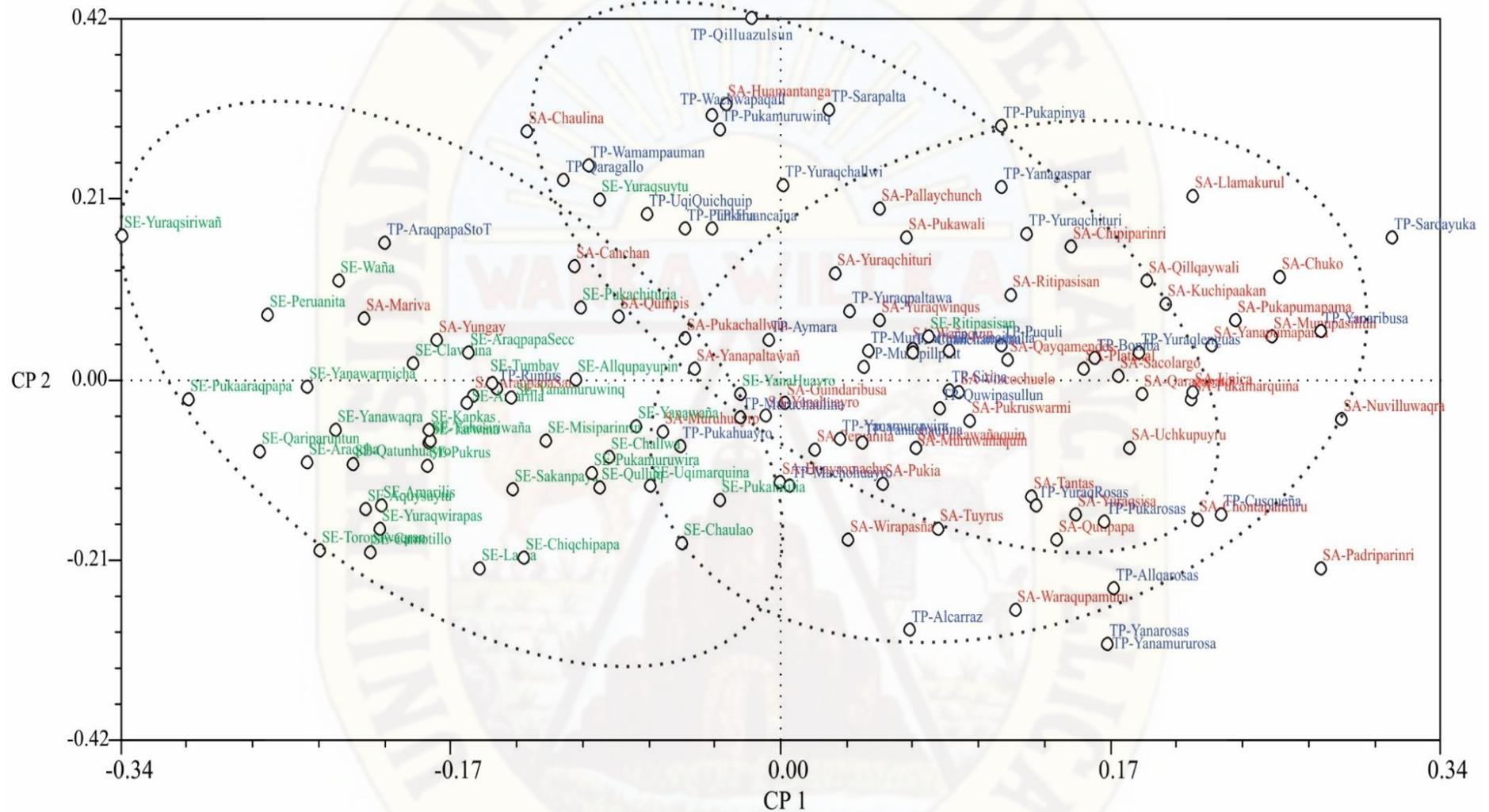


Figura 21. Coordenadas principales con coeficiente Jaccard, NTSYS 2.10p de 128 accesiones de papas (*Solanum spp.*) procedentes de, Seclla y Santo Tomás de Pata de la provincia de Angaraes región Huancavelica y Santillana provincia de Huanta región Ayacucho.

Santo Tomás de Pata y Secclla que difieren genéticamente, pero tiene las mismas características en cuanto al tubérculo se refiere y en el uso culinario sobre todo en el sancochado. A la papa huayro los agricultores clasifican según el color en yana huayro que existe del distrito de Secclla y Santillana pertenecen al mismo grupo pero difieren en marcadores microsatélites, huayro macho, muru huayro de Santillana, macho huayro, puka huayro de Santo Tomás de Pata, qatun huayro de Secclla son accesiones muy parecidas genéticamente, se encuentran juntas en el grupo, pero estas accesiones de acuerdo al análisis de los marcadores microsatélites difieren el uno del otro. Las accesiones de wira pasña de Santillana, yuraq wira pasña de Secclla, yana muru wira pasña de Santo Tomás de Pata, yana muru wira pasña de Secclla son accesiones preferidas en la preparación de platos típicos en las regiones Ayacucho y Huancavelica se encuentran en el mismo grupo, pero son diferentes los unos de los otros, siendo la diferencia mínima. Además en este grupo se observa que la distribución de las accesiones en la mayoría de casos las papas por distritos se encuentran formando grupos locales o cercanos genéticamente. El grupo III está formado por 11 accesiones 8.59% donde se encuentran el yungay, amarilis, clavelina, peruanita, yana warmicha, yana waqra, araqcha, puka araq papa, yuraq siri waña, araq papa y qaripa runtun. El primero de los nombrados proviene de Santillana, el yungay, que es una papa mejorada comercial que muy probablemente proviene del cruce con algunas de éstas accesiones, los restantes diez accesiones pertenecen a Secclla que en la parte final del grupo se encuentran las accesiones semisilvestres como los araq papa que brota, crece y se desarrolla conjuntamente con los maizales en los valles, mientras la accesión yuraq siri waña son las papas que habitan por encima de 4200 msnm, que se caracteriza por ser papa amarga que solo sirve para preparar el chuño. El grupo IV esta formado por una sola accesión (0.78%) denominada kapkas cuya procedencia es el distrito de Secclla, esta accesión no está relacionado con ninguna de la accesiones por encima de UPGMA coeficiente Simple Matching 0.70 unidades ultramétricas. El grupo V esta formado solamente por tres accesiones (2.34%) canchan, challwa y mariva, la primera y la tercera accesión pertenece al distrito de Santillana, que presentan tubérculos redondos, se trata de las papas mejoradas que en el mercado local y nacional son conocidos, siendo muy comerciales, mientras el challwa es una accesión que proviene de Secclla, cuyo tubérculo es elíptico, el grupo VI nuevamente está constituido solo por una accesión (0.78%) que es el puka muru wira pasña de Santo Tomás de Pata es una accesión muy diferente al resto de las papas de este tipo que se encuentran en el grupo más grande no comparte ninguna similitud a otras papas. El grupo VII esta formado por cinco accesiones (5.90 %) son qillu azul sunqu, punkina,

puka pinya, yana gaspar y sara palta todas de Santo Tomás de Pata formando un grupo local que se asemejan en muchas características microsatelitales o genéticas. El grupo VIII está formado por dos accesiones (1.56%) formados por araq papa de Santillana y Araq papa de Santo Tomás de Pata, que se parecen en muchas características genéticas, pero son genéticamente distintos, ambas se encuentran junto al cultivo de los maizales, estas papas 3.3no se siembran, sus “tubérculo semilla”, se mantiene conjundidos con el suelo, después del cultivo del maíz empiezan a brotar, crecer y desarrollarse dando la seguridad alimentaria a los agricultores y pobladores que a partir del dos de febrero se empieza a utilizarse, fecha que los lugareños conocen como “muchuy waraca” que significa que el suelo o el “pacha mama” ya empezó su producción para la alimentación del poblador andino que cuenta con ese valioso recurso genético que va abastecer poco a poco hasta inicio de las cosechas de los sembríos de campaña chica y grande. El grupo IX está integrado por una sola accesión (0.78%) llama kurul de tubérculos redondos que procede de Santillana es otra papa nativa que no posee semejanzas con otras accesiones. El grupo X esta constituido por tres accesiones (2.34%) yana waña, yana siri waña y waña, papas nativas cuya procedencia es Secclla, son papas de altura conocidas como papas amargas difieren en algunas características morfológicas según el color del tubérculo, mientras la forma de los tubérculos es similar, siendo éstas de diferentes tonalidades de color de ahí viene las denominaciones, crecen y producen por encima de los 4200 msnm, se utiliza para elaborar moraya o chuño de muy buena calidad de color totalmente blanco con buena presencia comercial, que es muy cotizado en las ferias comunales, en el mercado local y nacional. Finalmente el grupo XI esta compuesto por una sola accesión (0.78%) yana palta waña de Santillana se mantiene independiente no se asemeja a ninguna de las accesiones anteriores genéticamente, también es una papa nativa que se encuentran por encima de los 4200 msnm, cuenta con las mismas bondades del grupo X.

Del análisis de agrupamiento del dendrograma de la figura 22, de la accesiones procedentes del distrito de Santillana provincia de Huanta región Ayacucho, se muestreó 49 entradas de papas (*Solanum* spp.), de los análisis de 74 marcadores microsátélites, a un coeficiente de similitud 0.70 unidades ultramétricas se agruparon en seis grupos a UPGMA (Unweighted Pair Group Method using Arithmetic Averages). El grupo I esta integrado por una sola accesión (2.04%) qillqay wali de tubérculo oblongo-alargado, que en el grupo local se mantiene aislado del resto de las accesiones genéticamente es diferente del grupo de colección, según informes orales de los productores del lugar de muestreo, se utilizan en la cocina para preparar picantes, guisos, asimismo se utiliza en la elaboración de papa seca (cocopa) y de moraya o chuño. El grupo II

compuesto por dos entradas (4.08%) huamantanga y chaulina son parientes genéticamente, cuyos tubérculos son harinosos bien codiciados en la ferias comunales, mercado local e incluso nacional son bien solicitadas en los mercados de la capital (Lima). El grupo III es el más numerosos como que representa a toda la población, donde debemos resaltar que existe una duplicidad de muru wañaquin con puka wañaquin aunque en las características y color de tubérculo son diferentes se trata de una sola accesión molecularmente, pero diferente al wañaquin que viene a ser su pariente cercano pero es genéticamente distinto, siendo más bien su pariente cercano la guinda ribusa; dentro de las papas harinosas cotizadas por los consumidores son ritipa sisan, yuraq sisa, yana huayro, huayro macho, muru huayro, wirapasña se encuentran en este grupo, en el muestreo realizado se observó que estas “variedades” siembran en mayor extensión, que el resto que no es muy conocido por los consumidores y comerciantes, el resto de las papas son cultivados con la finalidad de matener la variabilidad para presentación en las ferias locales, regionales, nacionales e internacionales, organizadas por entidades locales como los concejos distritales, provinciales o gobiernos regionales, entidades nacionales como el misnisterio de agricultura, ONGs, etc.; cuando se hace mención de la papa huayro como yana huayro, huayro macho, muru huayro, realmente son entidades genéticamente diferentes como se avizora en el dendrograma, podemos afirmar que son parientes cercanos molecularmente, a pesar de que morfológicamente solo varían en el color y tamaño del tubérculo; la variedad UNICA es una papa mejorada que fue introducido en la agricultura del distrito de Santillana, en la actualidad se está convirtiéndose en comercial porque es requerido para las pollerías y restaurantes de las ciudades por ser utilizado sobre todo en la fritura, la extensión de su cultivo aumenta cada año desplazando a variedades nativas se encuentra en un grupo muy diferente al yungay, mariva y canchan que son variedades mejoradas; al final del grupo III se encuentran las variedades de munupa sillun, yana pumapa makin y puka pumapa makin, siendo su característica principal de los tubérculos tiene forma digitada, es decir, se parece a las manos de los primates y felinos, son variedades harinosas que cuentan con buena aceptación por el consumidor. El grupo IV comprende 4 accesiones el pallay chuncho, yungay, mariva y canchan; el pallay chuncho es una variedad nativa que se siembra en pequeñas extensiones se utiliza bajo diversas formas en el arte culinario de las comunidades campesinas, además se utiliza en la preparación de la papa seca y chuño; mientras el yungay, mariva y

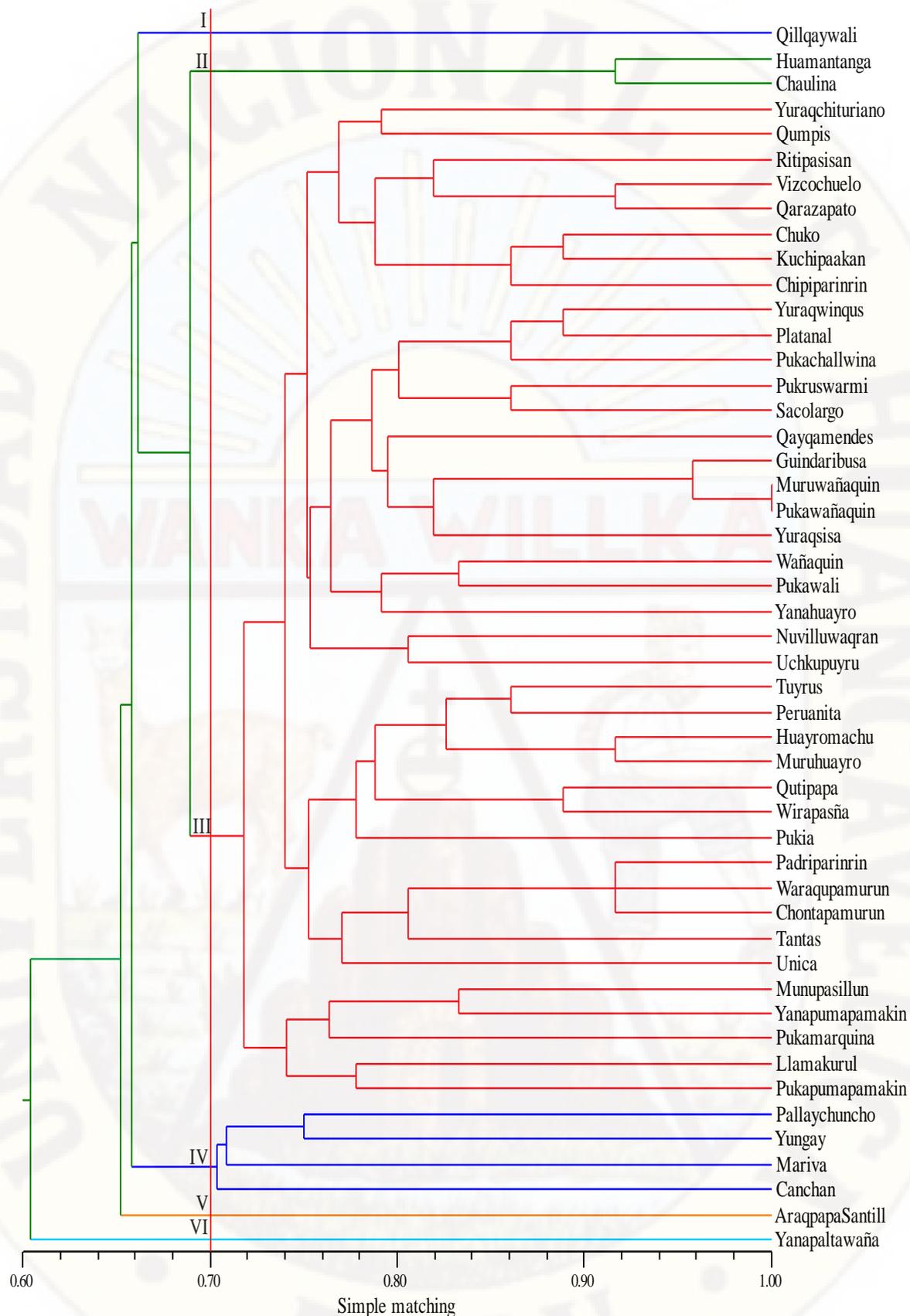


Figura 22. Dendrograma de 49 accesiones de papas (*Solanum spp.*) procedentes del distrito de Santillana provincia de Huanta región Ayacucho.

canchan son las papas mejoradas conocidas ampliamente en todos los mercados, se encuentran en este grupo, son papas que más se asemejan a las variedades semisilvestres y de altura. El grupo V corresponde al araq papa (2.04%), como ya se comentó de esta "variedad" es una papa que no se cultiva sino sus "tubérculo semilla" se mantienen en los terrenos de cultivo donde siembran maíz, creciendo juntamente con esta planta que se siembra en el mes de setiembre y para los primeros días de febrero sus tubérculos ya han madurado pudiendo ser extraídos y utilizados en la alimentación humana, en estos meses del año falta productos alimenticios del lugar saciando en algo las necesidades alimenticias, así colaborando en la seguridad alimentaria a los lugareños. Por último el grupo VI esta integrado por una sola accesión (2.04%) el yana palta waña, estas papas son propias de las partes más altas de las comunidades alto andinas, su característica principal es ser amargas, se siembra en extensiones regulares después de la cosecha lo transforman en moraya o chuño.

El dendrograma de la figura 23, se construyó usando coeficiente similitud de Simple Matching y el método de Agrupamiento de UPGMA (Unweighted Pair Group Method using Arithmetic Averages), de las accesiones procedentes del distrito de Santo Tomás de Pata provincia de Angaraes región Huancavelica, las muestras obtenidas fueron 40 de papas (*Solanum spp.*), de los análisis de 74 marcadores microsatélites, a un coeficiente de similitud 0.70 unidades ultramétricas se agruparon en ocho grupos. En el grupo I esta comprendido 18 accesiones (45%), es importante señalar que yana rosas y yana muru rosas son una sola accesión cuyos tubérculos son tuberosado que se diferencian en el color del tubérculos pero genéticamente es uno solo, en caso de puka rosas, yana rosas, allqa rosas y yuraq rosas son muy similares en forma variando en el color de los tubérculos, son diferentes accesiones molecularmente, son muy consumidas por los agricultores en sancochados y otros potajes. Las papas más consumidas y comercializadas son la yana ribusa, chanchamaína, yana muru wira pasña e yana chaulina, el resto de las papas se mantienen con la finalidad de conservar la diversidad. El grupo II esta integrado por cuatro accesiones (10%) yuraq palta waña, muru chituriano, yuraq chituriano y puquli, el primero de los nombrados crece en altitudes por encima de los 4200 msnm., son sembrados con el único propósito de transformarlos en chuño. El muru chicturiano y yuraq chituriano son papas alargadas, a veces falcado que tiende a enroscado son harinosas que se utiliza en diferentes potajes y en sancochados, comercialmente son bien aceptados en el mercado, pero según manifiestan los agricultores pocas papas llenan los envases (costales) incrementando precios en el transporte por esta razón se dificulta el traslado a lugares de comercialización. El

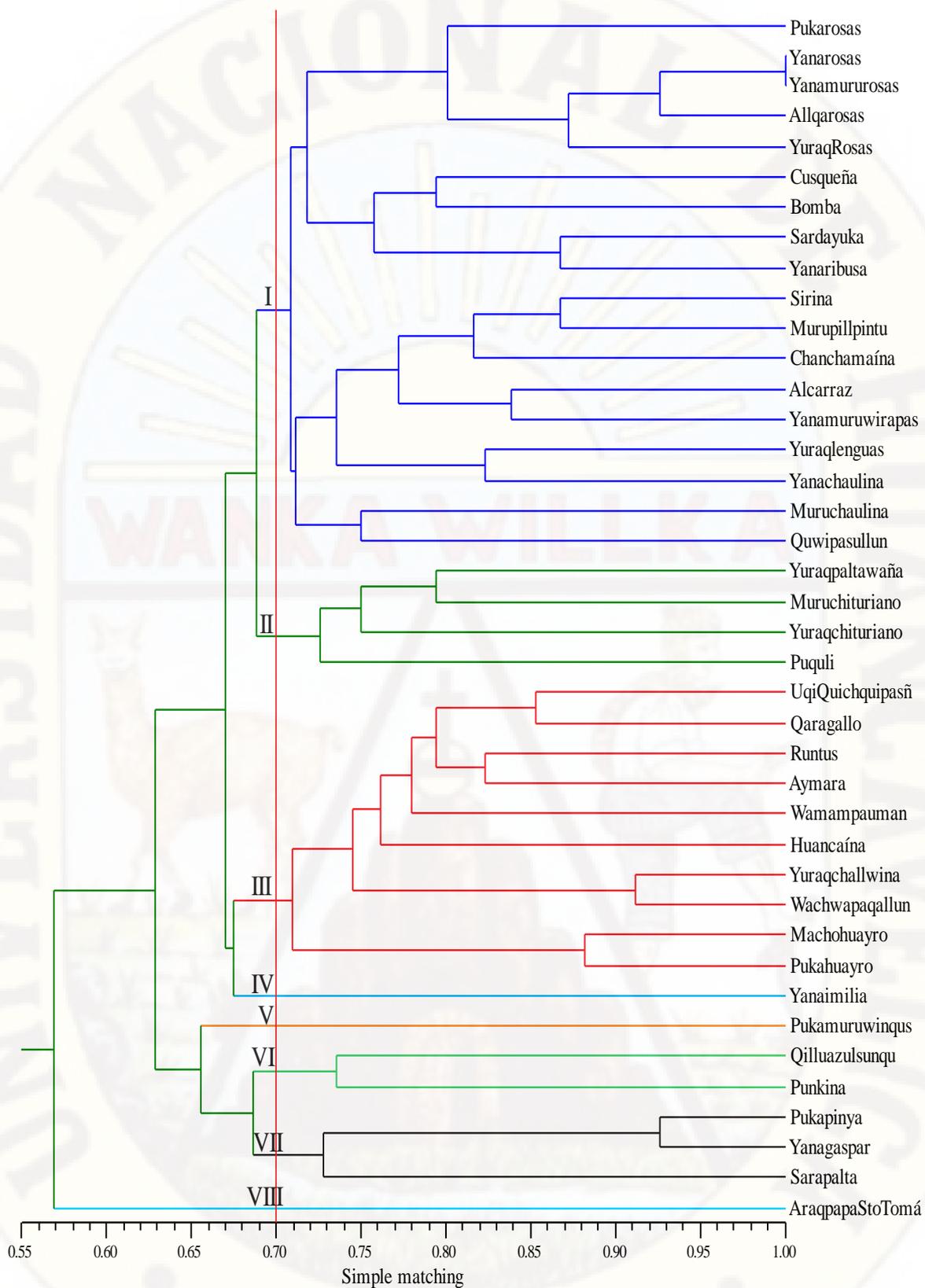


Figura 23. Dendrograma de 40 accesiones de papas (*Solanum spp.*) provenientes del distrito de Santo Tomás de Pata provincia de Angaraes región Huancavelica.

grupo III integra a diez accesiones (25%), es el segundo grupo más numeroso donde se encuentran las papas comerciales el runtus, huancaína, macho huayro y puka huayro, son las papas harinosas, que el comprador generalmente en la ferias prefieren en suficientes cantidades se compra con la finalidad de llevar a mercados de ciudades cercanos. El grupo IV conformado por una sola accesión (2.5%) yana imilla se trata de papas bastante pequeñas harinosas cuya siembra es en escalas menores para consumo directo. El grupo V compuesto por una sola accesión (2.5%) puka muru winqus, papas harinosas alargadas se destina para el consumo del agricultor. El grupo VI comprende a dos accesiones (5%) qillu azul sunqu y punkina, el primero es una papa harinosa comercialmente aceptada por el consumidor, conforme manifiestan los productores cada año crece su demanda en el mercado. El grupo VII esta integrado por tres accesiones (7.5%) puka pinya, yana gaspar y sara palta, las dos primeras papas son tuberosados cuya forma es característico, no es tan comercial se utiliza en consumo familiar. El grupo VIII con un solo integrante (2.5%) araq papa de Santo Tomás de Pata, como se ha comentado anteriormente participa en seguridad alimentaria de los agricultores de zona.

El dendrograma de la figura 24, se construyó usando coeficiente similitud de Simple Matching y el método de Agrupamiento de UPGMA (Unweighted Pair Group Method using Arithmetic Averages), de las accesiones procedentes del distrito de Seclla provincia de Angaraes región Huancavelica, las muestras obtenidas fueron 39 de papas (*Solanum spp.*), de los análisis de 74 marcadores microsátélites, a un coeficiente de similitud 0.70 unidades ultramétricas según el dendrograma se agruparon en ocho grupos. El grupo I es el más numeroso con 25 accesiones que representa el 64.10%, en este grupo se observa a la papa amarilla, yuraq wira pasña, puka muru wira pasña, camotillo, qatun huayro, peruanita, ritipa sisan y tumbay, son las papas harinosas muy requeridas en los mercados locales, regionales y nacional, más aún cuando éstas proceden de las comunidades campesinas alto andinas donde utilizan abonos orgánicos y la utilización de productos agroquímicos es mínimo, es decir, estas papas son casi productos orgánicos libre de muchos contaminantes que contienen las papas comerciales. El grupo II esta integrado por 3 accesiones (7.69%) constituido por challwa, yana muru winqus y qulluq son papas nativas que no tienen mucha trascendencia estas se cultivan con el único propósito de la variabilidad genética para que los agricultores puedan participar en ferias locales, regionales y nacionales donde otorgan premios a los participantes por el número de accesiones que presentan. El grupo III(7.69%) donde se encuentran yuraq siri waña, araq papa y qaripa runtun

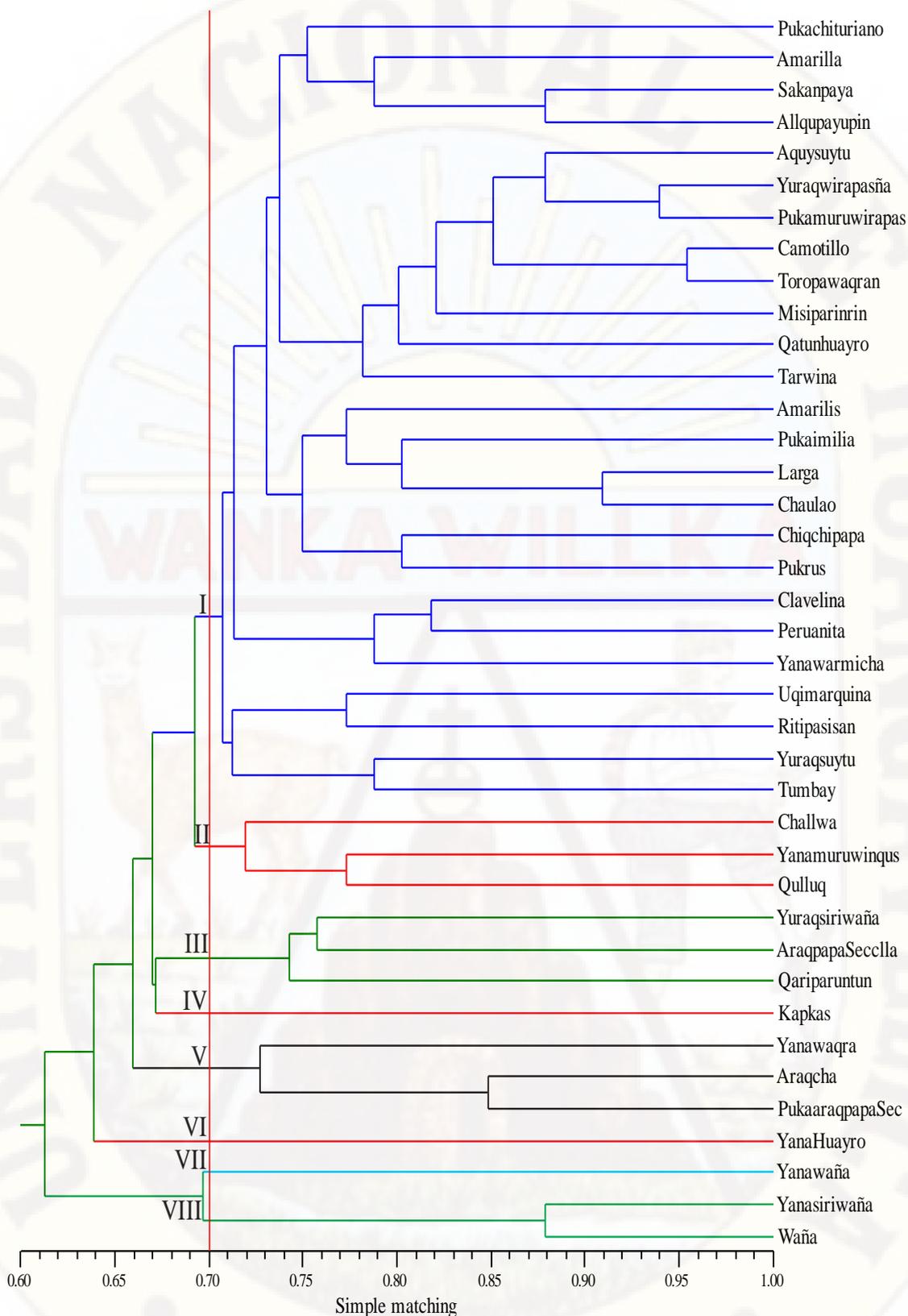


Figura 24. Dendrograma de 39 accesiones de papas (*Solanum spp.*) provenientes del distrito de Secclla provincia de Angaraes región Huancavelica.

el primero de los citados es una papa que se desarrolla a más de 4200 msnm, que son cultivados con la única finalidad de transformarlos en chuño cuyo producto es bien cotizados; el araq papa, como se ha comentado en los distritos anteriores perduran con el tiempo porque sus “semillas tubérculos” se mantienen en los suelos que cultivan maíz y son utilizados en la seguridad alimentaria; el qaripa runtun son papas consumidas por agricultores además son aceptados en las ferias comunales por los compradores por ser harinosas fácilmente utilizados en diferentes potajes. El grupo IV constituido por una sola entrada (2.56%) kapkas, es otra papa que se cultiva específicamente para transformarlos en moraya o chuño, cuando se sancocha esta papa no llega cocinarse totalmente, “kapka” en quechua significa “algo duro”, “faltó cocinarse”, pero en muchos casos lo utilizan en guisos, picantes y en forma rallada para preparar sopa de papa, que por informes orales de los productores son muy apetecibles al paladar. El grupo V (7.69%) comprende tres entradas, donde están yana waqra, araqcha y puka araq papa, la primera es una papa falcada de ahí el nombre porque se parece a las astas de los toros, son utilizados en diferentes platos que se preparan en las zonas productoras; las dos últimas morfológicamente según el tubérculo son papas parecidas, pero el araqcha se siembra junto con las demás papas nativas, mientras el araq papa es semisilvestre que participan en la seguridad alimentaria. El grupo VI representado por yana huayro (2.56%) las papas cuya denominación es huayro son harinosas y muy parecidas en la morfología de sus tubérculos, pero son totalmente diferentes molecularmente a las demás accesiones conocidas como huayro, esta papa como el resto de esta denominación son muy cotizados en las ferias y mercados. El grupo VII constituido por yana waña (2.56%) que es una accesión que crece por encima de los 4200 msnm. El grupo VIII integrado por yana siri waña y waña (5.12%) igual que en el grupo VII son papas específicamente cultivados para producir chuño.

4.2. Discusión de resultados

4.2.1. Perfiles moleculares de la diversidad genética de papa *Solanum spp.*

Según las tablas 13 y 14, el más alto valor alcanza el iniciador STG-0001 con un valor de 0.287, este valor indica que el PIC (Polymorphic Information Content) es el más informativo, indicando que existe variabilidad genética entre las 128 accesiones; mientras el cebador STM-0037 con un valor de 0.159, es el que informa en menor grado el polimorfismo. Obteniendo el promedio de los ocho iniciadores del SSR se tiene un promedio de 0.238, el cual es un buen indicador del polimorfismo que se encuentra en los distintos cromosomas de las papas en estudio. En la tabla 8 se muestra el mejor promedio del índice de combinación de iniciadores y promedio de PIC son 2.208 y 0.238 respectivamente, ambos de la población de Santo Tomás de Pata. Al respecto Alvarado (2008)⁹⁷,

determinando PIC y riqueza alélica en cada locus encuentra que en 138 alelos, el número de alelos por locus varió desde 3 hasta 13, el PIC fue calculado para cada iniciador, en una población total de 40 cultivares nativos, los valores variaron desde 0.361 hasta 0.848. Además menciona que la ventaja que tienen el uso de marcadores microsatélites en papa sobre otros sistemas de marcadores dominantes, es su capacidad de este de reflejar la ploidia de los genotipos. En su estudio usó 40 cultivares nativos con ploidia de 2x, 3x, 4x y 5x y observó en muchos casos que han presentado alelos de más, es decir, que han excedido su ploidia. Por otra parte en el análisis de agrupamiento para los marcadores SSR obtuvo un valor de similitud que varía desde 0.262 a 0.964. Cadima et al., (2013)²⁹, en el estudio del “uso de marcadores moleculares microsatélite para el análisis de la diversidad genética de papa nativa de Bolivia”, menciona que el índice de contenido polimórfico para un mismo microsatélite puede variar mucho entre especies, los valores por microsatélite encontró en un rango de 0.13 a 0.87 y en cada especie el mayor PIC se dio en un microsatélite diferente. Cadima-Fuentes et al., (2017)¹¹⁵ en su estudio “Comparación de niveles de diversidad genética de papa entre Centros de Agrobiodiversidad y la Colección Nacional de Bolivia”, encuentra los valores de PIC por microsatélite en un rango de 0,13 a 0,85 para la colección de papa del Norte de Potosí y en cada especie el mayor valor de PIC se tuvo en un microsatélite diferente, estos resultados corroboran los resultados encontrados en el presente trabajo. En Boyacá Colombia al trabajar con 30 accesiones con 5 marcadores microsatélites donde el contenido de información polimórfica (PIC) varió entre 0.368 hasta 0.574, que son valores ligeramente superiores al reportado en el presente trabajo, estos resultados indican que los marcadores evaluados para papa son informativos, logrando identificar niveles de variabilidad genética en el material evaluado⁶³. Soto et al (2014)¹¹⁷, al realizar una investigación con 79 variedades de papa nativa (*Solanum spp.*) procedentes de cinco regiones del Perú (Ayacucho, Cajamarca, Cusco, Huancavelica y Puno, lograron identificar altos niveles de diversidad genética dado por los valores de PIC = 0.55 – 0.85, los valores encontrados en el presente trabajo son menores. Así mismo hacen referencia que la respuesta más probable para que las cinco regiones presenten valores similares de polimorfismo, además de presentar cantidades similares de alelos totales, de alelos exclusivos y de no formar grupos homogéneos, probablemente se deba a la selección realizada por los agricultores (realizado desde los primeros pobladores andinos) que tienden a conservar diversos cultivares de papa; pero que entre todas ellas comparten las mismas características de utilidad comercial y de consumo (sabor, tamaño, productividad, etc.) que hace que prevalezca un pool de genes específico, además no todos los agricultores mantienen las mismas variedades, pero si todas ellas se encuentran dentro de un solo pool de genes utilitarios. En el caso de

Ayacucho, el tener un mayor número de muestras no significó encontrar un mayor número de alelos. Por lo que se puede afirmar que conservar el mayor número de variedades en una región no necesariamente significó conservar la mayor cantidad de variación genética, ya que la diversidad genética dentro de una especie no se distribuye homogéneamente a través de los ambientes donde se desarrolla (Soto et al., 2014)¹¹⁷. Mesfin et al., (2016)¹⁴⁰, en la diversidad genética en cultivares de patata (*Solanum tuberosum*) con marcadores de repetición de secuencia simple (SSR), encontró el valor PIC oscila entre 0,51 y 0,98 que supera a los resultados hallados. Hong y Huachun (2014)¹⁴⁵, en el uso de SSR para evaluar la diversidad genética de cultivares de patata de la provincia de Yunnan (suroeste de China), reportan que el contenido de información de polimorfismo (PIC) varió de 69.31% a 93.67% (promedio de 86.47%), valores cercanos a los encontrados en la investigación. Nuñez (2015)¹²⁴, en análisis de la variabilidad genética de las ocas cultivadas (*Oxalis tuberosa* Mol.) de la región Cajamarca, encuentra los valores de PIC que varían de 0.11 a 0.17, se observa que la combinación más informativa es el par de iniciadores E40-M50 y E32-M59 con un valor total de PIC de 0.17 y la menos informativa son los pares de iniciadores E45-M35 y E40-M35 con un valor total de PIC de 0.11 lo que quiere decir que presentan una baja capacidad para detectar polimorfismos en la colección en estudio. Los resultados encontrados por los autores citados concuerdan con los resultados obtenidos en el presente trabajo. Beovides (2015)¹³⁹, en caracterización de la variabilidad genética e identificación de marcadores moleculares asociados al porcentaje de materia seca en accesiones cubanas de yuca (*Manihot esculenta* Crantz), encontró PIC superior a 0.9 obteniendo estos valores altos porque las accesiones provienen de diez países distantes debido a que existe una amplia variabilidad, que no concuerda con los resultados obtenidos.

Los valores promedio del PIC por iniciador en el distrito de Santo Tomás de Pata es igual al promedio de la población total cuyo valor es de 0.238, mientras Santillana y Secclla con valores de PIC 0.226 y 0.225 respectivamente son ligeramente menores (tablas 8 y 9). Estos valores son muy similares a los encontrados por Cadima et al., (2013)²⁹, para el caso de *S. x curtilobum* y *S. goniocalyx*, los valores PIC promedio (0.42 y 0.25 respectivamente), son mayores de los valores encontrados en las 128 accesiones y por distritos. Se conoce que las muestras de Santillana, Santo Tomás de Pata y Secclla fueron 49, 40 y 39 accesiones respectivamente, siendo 128 accesiones analizadas. Pérez (2004)¹¹⁶, menciona cuanto más grande es la población aumenta más la probabilidad de encontrar nuevos alelos con frecuencias bajas. Juyó (2012)³⁷, al estudiar en cinco poblaciones los valores promedios de información polimórfica de los SSRs un valor promedio de (PIC = 0,465)

en un rango de 0.020 a 0.801, indicando que son marcadores medianamente informativos; por lo tanto nuestro resultado de PIC se encuentran dentro del intervalo mencionado. Los resultados hallados probablemente sean porque en el estudio se encuentran papas mejoradas, nativas y semisilvestres. La razón principal en el incremento del uso de microsatélites como herramienta en la caracterización molecular, radica en que proveen la más alta incidencia de polimorfismo en comparación con otras técnicas usadas para este mismo fin⁷⁷. Pacheco (2015)¹³⁸, “Caracterización morfológica y molecular de mashua (*Tropaeolum tuberosum* ruiz & pavón) de los departamentos de Cusco y Cajamarca”, encuentra PIC entre 0.23 hasta 0.32 que en parte corrobora nuestros resultados. Gamboa y Peña (2018)¹⁴², en diversidad genética de papas nativas (*Solanum spp.*) del distrito de Vilcashuamán, Ayacucho-Perú, mediante AFLP, logrando obtener valores de PIC de 0.45 y 0.40 para las combinaciones E38 – M49 y E13 – M49, respectivamente, siendo valores altos que no coinciden con los resultados obtenidos.

4.2.2. Variabilidad de marcadores moleculares microsatélites

Según la tabla 15, se muestra el porcentaje de loci polimórfico de las tres poblaciones estudiadas con una amplificación de 74 locus producto de ocho pares de marcadores moleculares microsatélites, donde el más alto valor se encuentra en las 49 accesiones de la población de Santillana con un valor de 97.30%, Santo Tomás de Pata con 91.89% de loci polimórfico y Secclla se analizó 39 accesiones con un 89.19 % de loci polimórfico, siendo el menos polimórfico. El promedio de *loci* polimórficos de todas las accesiones analizadas (128) fue de 92.79% con una desviación estándar de 2.38%. Alvarado (2008)⁹⁷, hace referencia que en cada genotipo la amplificación de loci específicos revela la presencia de uno o más alelos por locus, según el grado de ploidia, por eso se observa dos, tres, cuatro, cinco o más alelos por locus; ya que tenemos cultivares nativos con estas ploidias. Onamu et al., (2015)¹¹³, al estudiar la “diversidad genética entre variedades de *Solanum tuberosum* en México” encontró un valor de loci polimórfico de 86.2%. Las actividades humanas, la adaptación a zonas agroecológicas la distribución, colonización, sistema de apareamiento, tamaño de las poblaciones y el método de propagación afectan el nivel de diversidad genética entre y dentro de poblaciones. Torres et al., (2012)¹⁹ en integración de microsatélites en el mapa ultradenso del *Solanum tuberosum*, encuentran que los marcadores microsatélite son muy polimórficos, registrando altos valores de PIC, de los 74 microsatélites evaluados 61 marcadores resultaron ser polimórficos (82%), solo un marcador no logró amplificarse, mientras que 12 fueron monomórficos. Rojas (2007)⁵², en análisis de diversidad genética de papas nativas de Chahuaytire (Pisac-Cusco), presentaron índice de diversidad más altos con promedios para dos poblaciones de 0.762 (Chahuaytire) y 0.776 (CIP

repatriados). Éstos resultados concuerdan con los trabajos reportados. Además es necesario mencionar el polimorfismo es debido a que las papas nativas de cada población en estudio, proceden no solo de las zonas de muestreo sino es introducido de las zonas aledañas y en algunos casos son llevados por los agricultores después de asistir a las exposiciones en las ferias, con la finalidad de aumentar mayor diversidad en sus cultivos. Orona (2004)¹²⁸, manifiesta que el agolpamiento de unidades de distancias mínimas y promedios aritméticos permitieron distinguir las diferencias genéticas existentes entre los 25 genotipos estudiados, lo que concuerda con los resultados obtenidos por Miller y Spooner (1999), citados por Orona (2004)¹²⁸, quienes encontraron altos niveles de polimorfismo utilizando la técnica de microsatélites en *Solanum tuberosum*, también mencionan que los microsatélites pueden ser una herramienta útil para detectar diferencias genéticas entre variedades cercanamente relacionadas. Beovides (2015)¹³⁹, en accesiones cubanas de yuca (*Manihot esculenta* Crantz), encontró loci polimórficos entre 91.2 a 100% que corrobora con los resultados obtenidos. Onamu R y Legaria J (2014)¹⁴³, en estudio de diversidad genética entre variedades de papa (*Solanum tuberosum* L.) cultivadas en México usando marcadores RAPD e ISSR, llega encontrar el porcentaje de loci polimórficos (P) entre los cultivares fue de 86.23%, ligeramente menor al encontrado en el presente trabajo. Galani et al., (2015)¹⁴⁴, en caracterización molecular de la papa India (*Solanum tuberosum* L.) Variedades para la endulzamiento inducida por frío utilizando marcadores de SSR, de los 37 loci polimórficos (88%) mostraron un grado variable de polimorfismo y solo 5 loci (12%) fueron monomórficos de ambos autores los resultados son cercanos. Song et al., (2016)¹⁴⁶, en el análisis de SSR de la diversidad genética entre 192 cultivares de papa diploides, en China encontraron 98.98% de polimorfismo solamente una banda fue monomorfa, resultado que coincide con el presente trabajo. Morillo et al., (2016)¹⁴¹, en caracterización molecular de cubios (*Tropaeolum tuberosum* Ruiz y Pavón) en el departamento de Boyacá Colombia, encuentran el % de loci polimórfico que varía desde 71 al 100% con un promedio de 88%, que coincide con el trabajo.

En la tabla 16, los índice de Shannosn's (I) para Santillana, Santo Tomás de Pata y Seclla con valores de 0.358, 0.373 y 0.355 respectivamente con un promedio de desviación estándar de 0.027, los valores para los mismos distritos para la heterocigosidad esperada (He) son 0.225, 0.239 y 0.225 respectivamente siendo el promedio y desviación estándar de 0.020. El promedio de Índice de información de Shannon's (I) de todas las accesiones analizadas fue de 0.362 con una desviación estándar de 0.015. El promedio de la Heterocigosidad esperada (He) de todas las accesiones analizadas fue de 0.230 con una desviación estándar de

0.011. Estos valores obtenidos podrían ser el producto de la conservación de las papas nativas que se siembran año tras año utilizando los tubérculos de las mismas plantas de papa cosechadas en el lugar de muestreo, con la finalidad de conservar la biodiversidad que se encuentran en su localidad. Juyó (2012)³⁷, al estudiar 146 genotipos de la diversidad genética y estructura poblacional en genotipos diploides de papa, reporta valores de heterocigosidad media esperada o de diversidad genética para todos los loci en todas las poblaciones estudiadas correspondió 0.43, considerándose un valor relativamente alto de diversidad para poblaciones de papas diploides comparando con los valores de heterocigosidad reportada para *Solanum tuberosum* grupo Andigenum ($H = 0,54$) (investigación que realizaron Sukhotu and Hosaka, 2005, citado por Juyó 2012)³⁷ donde se incluyen para estos análisis poblacionales genotipos que son diploides, triploides y tetraploides. Estos resultados sugieren que la población de papas diploides, representa y reúne fuertemente la diversidad genética para este grupo de papas que se distribuye desde el oeste de Venezuela hasta el centro de Bolivia, confirmando su condición de colección central. A la fecha esta investigación se constituye en el primer análisis de diversidad genética poblacional en el que se compara la diversidad entre poblaciones nativas y de mejoradas para papas diploides del grupo *Andigenum*. El mismo autor menciona en poblaciones naturales y de mejoramiento disminuyen los valores de heterocigosidad por los procesos de selección artificial algunos de los SSRs de los genotipos empleados no fueron tan polimórficos. Sánchez (2017)⁶³, en el “estudio de la variabilidad genética en accesiones de papa (*Solanum tuberosum* L.), mediante marcadores SSRs”, mencionan que la variabilidad genética es la heterocigosidad; en su trabajo encontraron valores de heterocigosidad que varió en un rango de 0,212 (STMS1049) a 0,443 (STMS2022), con una diversidad promedio de 0,313, que coincide con los resultados reportados. Navarro *et al.* (2010)⁸², al analizar 19 poblaciones de *Solanum tuberosum* L. y *Solanum phureja*, con cinco marcadores de tipo RAMs, reportaron un valor promedio de 0,291, lo que indica que existe una alta variabilidad genética dentro de la población; estos valores se aproximan a los obtenidos en esta investigación, al tratarse de condiciones similares por encontrarse en la región andina. Roca (2015)¹¹⁸, menciona que la heterocigosidad (H_e) es también conocida como diversidad genética de Nei⁹⁹. Sin embargo para papa nativa esta definición no es del todo correcta ya que el cultivo de papa proviene de cruces al azar porque las papas nativas son un grupo heterogéneo, con distintas ploidias y por esta razón presentan frecuencias genéticas poblacionales diferentes. Los valores de heterocigosidad esperada varían desde 0.212 a 0.902 en diferentes comunidades, (tomando el valor promedio de los valores de heterocigosidad por cada comunidad en estudio y microsatélite varían

desde 0.64 a 0.70) con un promedio de $H_e = 0.67$. La heterocigosidad esperada es el que predice el nivel o grado de heterocigosidad que presentan en promedio los distintos grupos por loci, considerando que el número de alelos en la especie por ser tetraploide puede ir de uno a cuatro, los individuos homocigotos, es decir que presentan un solo alelo, tendrán un índice de heterocigosidad igual a 0, en cambio los que presenten el máximo de alelos (cuatro) presentarán un valor igual a 1, es decir 100% de heterocigosidad¹¹⁶. Morillo et al., (2016)¹⁴¹, en caracterización molecular de cubios (*Tropaeolum tuberosum* Ruiz y Pavón) en el departamento de Boyacá Colombia, utilizando siete Marcadores Microsatélite Amplificados al Azar (RAMs), hallaron heterocigosidad estimada entre 0.25 a 0.42, que concuerdan con los resultados encontrados.

4.2.3. Distancias genéticas de marcadores moleculares microsatélites

En la tabla 17, se muestra la distancia genética entre las accesiones de papa que conforman las tres poblaciones. Las poblaciones que presentan mayor relación genética comprenden a Santillana y Santo Tomás de Pata siendo la identidad genética de Nei de 0.986 y forman un grupo a una distancia ultramétrica de 0.986 (figura 19), lo cual indica que las accesiones de papa de estas poblaciones presentan mayores características genéticas en común. Las poblaciones de Santo Tomás de Pata y Seclla presentan una identidad genética de Nei de 0.976, valor que no es muy distinto a lo observado entre las poblaciones de Santillana y Seclla cuyo valor de identidad genética es de 0.975. Por lo tanto, se observa que las accesiones de la población de Seclla son más diferentes genéticamente que las accesiones de las poblaciones de Santillana y Santo Tomás de Pata (figura 19). Orona et al., (2004)¹¹⁹, al caracterizar variedades y líneas de papa (*Solanum tuberosum* L.) en México utilizando marcadores RAPD y SSR, distinguieron las diferencias genéticas de la mayoría de los genotipos como ha sucedido en otros estudios, los que concuerda con los resultados obtenidos. Pérez (2004)¹¹⁶, del total de 273 accesiones de papa evaluando con siete iniciadores moleculares calculando con diversidad de Nei, encontró en cuatro poblaciones diferencias, el grupo Colección alcanzó 94.2%, el grupo Chiloé con 92.6%, Chonos tuvo 97.6% y el grupo Europea 95%, además con el propósito de establecer las relaciones de parentesco entre el material analizado, se calculó una matriz de distancia genética de Nei (1978)⁹⁹, obteniéndose un dendrograma con base en la matriz de distancias genéticas que fueron muy bajas entre grupos. La mayor distancia se produjo entre Chiloé y Europea (0.01) y la menor entre Colección y Europea (0.0006), el grupo Chonos presentó igual distancia con Chiloé y Colección (0.0034), pero fue más distante de las variedades europeas (0.0063). Los resultados de la tabla 12 y figura 17 son corroborados por

los datos hallados en trabajos de investigación citados. La distancia genética de Nei ha sido formulada a partir de los siguientes supuestos: tasa de mutación constante e igual para todos los loci; poblaciones con tamaños efectivos iguales y constantes a través de las generaciones; las poblaciones están en equilibrio mutación-deriva⁹⁹. Soto (2006)⁹ en el análisis de la diversidad de papa de cinco regiones Ayacucho, Cajamarca, Cuzco, Huancavelica y Puno mediante uso de SSR, encuentra la existencia de un mayor número de variaciones genéticas (polimorfismo) para la zona de colecta de Puno, donde la región de Puno quedó en segundo lugar con respecto a riqueza alélica (120 alelos), siendo superado por Cuzco (130 alelos), no se puede afirmar que Cuzco tiene mayor diversidad que Puno debido a que las colectas en Cuzco se hicieron en 3 diferentes agricultores mientras que las de Puno fueron hechas en un solo agricultor, Hawkes (1994)⁴⁸ y Sponner (2005)¹¹, según los estudios evolutivos ratifican los resultados obtenidos. Mesfin et al., (2016)¹⁴⁰, en el papel de investigación de longitud completa evaluación de la diversidad genética de los agricultores y mejoras cultivares de patata (*Solanum tuberosum*) De Eritrea utilizando marcadores microsatélite, determinó el índice de matriz de distancia genética que oscila entre 0.011 y 0.048, concordando con los resultados encontrados. Mariette et al., (2017)¹⁴⁷, en diversidad genética y colección central para cultivares de papa (*Solanum tuberosum* L.) de Camerún revelados por marcadores de SSR, encontraron que las distancias genéticas estaban significativamente correlacionadas con las distancias geográficas variando desde 0.102 (entre elevaciones medias y altas) y 0.179 (entre elevaciones bajas y altas) y fueron más bajas que las relacionadas con las ubicaciones, resultados que elevados a los encontrados. Hong y Huachun (2014)¹⁴⁵, en diversidad genética de cultivares de papa en la provincia de Yunnan China, reportan resultados de coeficiente de similitud genética promedio 98,35%, la provincia de Yunnan es una zona montañosa los resultados de la diversidad genética dependen de la integridad de las colecciones, este hallazgo coincide plenamente con nuestros resultados. Beovides (2015)¹³⁹, en accesiones cubanas de yuca (*Manihot esculenta* Crantz), encontró valores de similitud genética entre las colecciones de Nigeria - Guatemala (0,1036), Nigeria - Colombia (0,1045); Argentina - Venezuela (0,1155) y Argentina - México (0,1162), que no concuerdan con los resultados obtenidos.

Del análisis de agrupamiento del dendrograma de la figura 20, de relaciones entre las variedades usando coeficiente de similitud de Simple Matching y el método de Agrupamiento de UPGMA (Unweighted Pair Group Method using Arithmetic Averages) y coordenadas principales (figura 21) con coeficiente Jaccard, con NTSYS 2.10p, del análisis de 74 marcadores microsatélites, se agruparon en once grupos las 128

accesiones de papas (*Solanum* spp.) procedentes de los distritos de Santillana provincia de Huanta región Ayacucho y de los distritos de Santo Tomás de Pata y Secclla de la provincia de Angaraes región Huancavelica, a 0.70 unidades ultramétricas. Donde la variabilidad genética de las accesiones analizadas manifiestan proceder de poblaciones polimórficas con tendencia de ser estrechos formando grupos familiares por distrito y dentro de los distritos, el primer grupo formado por trece accesiones, donde el primero de la figura pertenece a la población de Santillana y doce de ellos pertenecen al distrito de Santo Tomás de Pata, donde se observa que se forman grupos familiares, en el grupo II encontramos 87 accesiones, donde los primeros 25 variedades están distribuidos por las tres poblaciones, del 26 al 39 forman un grupo local las papas de Santillana, del 40 al 51 prevalecen de Secclla, 52 al 69 destacan nuevamente de Santillana, del 70 al 76 sobresalen de Secclla, del 77 al 87 predominan papas procedentes de Santo Tomás de Pata, claramente se demuestra que se agrupan en grupos locales con algunas accesiones que probablemente hayan sido introducidos dentro de estas poblaciones. El grupo III predominantemente es representado por accesiones de Secclla, en los grupos del IV al IX sobresalen Santo Tomás de Pata, finalmente en los grupos X y XI destacan papas de Secclla. Resultados que indican valores altos de similitud genética, es decir, estas poblaciones presentan mayor polimorfismo cuyo promedio es de 92.79% (tabla 8), donde se observó que el patrón de agrupamiento responde al lugar de las accesiones notándose claramente la formación de grupos familiares por lugar de origen. El dendrograma representa la diversidad del individuo con respecto a los demás miembros de la muestra. Ponce et al., (2013)²⁵, en caracterización molecular de papas cultivadas por uso de microsatélites, menciona que una alta disimilitud promedio en un conjunto de individuos puede representar una elevada diversidad genética en dicha muestra; al evaluar el agrupamiento desde el punto de vista regional se apreció una tendencia moderada de agrupamiento de acuerdo a la región geográfica de procedencia, que estaba determinada por la ploidia de sus miembros. Peñafiel (2008)¹⁰⁹, al evaluar la variabilidad genética del tomate de árbol (*Solanum betaceum* Cav.) en tres provincias del Ecuador por medio de marcadores microsatélites detectó valores altos de similitud genética entre las accesiones (80 - 100%). El valor promedio de similitud genética entre las 50 accesiones analizadas con los SSRs fue de 0.85 ± 0.10 . Aún dentro de cada provincia y dentro de cada variedad, el promedio de similitud genética estuvo por encima del 80%. Orona et al., (2004)¹¹⁹, evaluaron con la técnica de SSR's con seis pares de iniciadores, los cuales produjeron en total 79 bandas, 70 (88.61%) de ellos fueron polimórficos. Cadima et al., (2013)²⁹, trabajando con microsatélites encuentra que los valores de similitud entre las accesiones utilizando el coeficiente de Jaccard pudo realizar agrupamientos mediante

el método UPGMA, que fueron visualizados en un dendrograma una estructura genética clara y definida donde se puede observar que la población se divide básicamente en dos grandes grupos A y B a un coeficiente de similaridad de 0.26. En resumen el análisis de conglomerados permitió visualizar las diferencias y relaciones genéticas entre especies y dentro de las especies en cuanto a diversidad. Alvarado (2008)⁹⁷, encuentra un dato muy importante que coincide con los resultados obtenidos, de que en la parte final del dendrograma se agrupan los cultivares de papas amargas y al ser agrupadas por el árbol las ponen aisladas en la parte final siendo estas las más distantes en similaridad. Orona (2004)¹²⁸, con respecto a las relaciones genéticas observadas en los dendrogramas para cada sistema de marcador, en ambas técnicas las variedades permanecieron estrechamente relacionadas bajo los dos sistemas de marcadores, en la técnica de SSR una mejor discriminación entre genotipos, la línea procedente de Argentina fue la más divergente. Milbourne *et al.*, (1997)⁶¹, manifiesta que la técnica de SSR es muy eficiente en este tipo de investigaciones, debido a que es capaz de identificar variación en sitios determinados. Todos los autores mencionados coinciden con los resultados obtenidos.

Del análisis de agrupamiento del dendrograma de la población de Santillana provincia de Huanta región Ayacucho (figura 22), de relaciones entre las variedades usando coeficiente de similitud de Simple Matching y el método de Agrupamiento de UPGMA, del análisis de 74 marcadores microsatélites, se agruparon en seis grupos las 49 accesiones de papas (*Solanum spp.*) a una distancia de 0.70 unidades ultramétricas. El muro wañaquin y puka wañaquin en el segundo grupo es un duplicado, es decir, es la misma accesión aunque existe diferencias en los tubérculos son genéticamente lo mismo, Soto (2006)⁹, menciona la presencia de variedades duplicadas indicaría la existencia de un pequeño grado de sobreestimación de la diversidad genética, específicamente en el caso de las 2 variedades que provienen de la misma región y del mismo agricultor. De este mismo lugar se realizó muestreo de cuatro variedades de papas mejoradas o comerciales como son la UNICA, Yungay, mariva y canchan. La UNICA se encuentra en el grupo II diferenciándose en las características moleculares y genéticas del resto de las variedades mejoradas, por lo tanto existe diferencia genética de las tres variedades mejoradas. Las variedades yungay, mariva y canchan se encuentran en el extremo del grupo III, siendo éstas muy diferentes en el acervo genético de la variedad UNICA. Ponce *et al.*, (2013)²⁵, cuando evalúan el agrupamiento por variedades nativas y mejoradas observaron que las variedades mejoradas se agrupan en un extremo del dendrograma. Al mismo tiempo Spooner *et al.*, (2007)¹²⁰ reportan que los cultivares modernos de la especie *Solanum tuberosum subsp. Tuberosum* se ubican

en una pequeña región en un extremo del dendrograma de las variedades estudiadas, resultando que las variedades mejoradas están más emparentadas entre sí que con las nativas, y a la vez nos indica que existe un acervo genético estrecho en las variedades mejoradas⁴⁴, Spooner et al., 2005)¹¹ mencionan que los cultivares modernos, variedades mejoradas representan una menor diversidad genética comparadas con las variedades nativas. Todos estos autores corroboran los resultados obtenidos que se observan en la figura 20. Por otra parte forman dos grupos diferentes (V y VI) las papas nativas arap papa y yana palta waña, el primero es una semisilvestre que se encuentran junto a los cultivos de maíz en las zonas o valles que participan en la seguridad alimentaria de los agricultores y la segunda es una accesión nativa que se encuentra en las partes más altas por encima de los 4200 msnm., estas muestras no comparten ninguna característica con el resto de la población de Santillana. Spooner y Hetterscheid (2005)⁴⁴, mencionan un par de puntos acerca de los resultados obtenidos: (i) que la base o acervo genético de las variedades mejoradas peruanas no es tan estrecha y (ii) que las variedades mejoradas tienden a agruparse distintamente de las variedades nativas. Orona (2004)¹²⁸, menciona que las técnicas de SSR y polimorfismo del ADN amplificado al azar (RAPD) utilizadas en su investigación diferenciaron los 25 genotipos evaluados y permitieron establecer las relaciones genéticas entre variedades. La similitud genética estimada por la huella genética, es una herramienta útil en los programas de mejoramiento genético de papa ya que puede permitir la toma de decisiones en la selección de genotipos para ser usados en los programas de mejoramiento (Ghislain et al., 2001)⁵; Milbourne et al., (1997)⁶¹.

Del análisis de agrupamiento del dendrograma de la población de Santo Tomás de Pata provincia de Angaraes región Huancavelica (figura 23), de relaciones entre las variedades usando coeficiente de similitud de Simple Matching y el método de Agrupamiento de UPGMA, del análisis de 74 marcadores microsatélites, se agruparon en ocho grupos las 40 muestras de papas (*Solanum spp.*) a una distancia de 0.70 unidades ultramétricas. Las accesiones denominadas rosas (grupo I, 42.5%) se diferenciaron en el muestreo de campo por el color de los tubérculos, en éstas papas las accesiones yana rosas y yana muru rosas se trata de la misma accesión, es decir son duplicados, puka rosas, allqa rosas y yuraq rosas varían en sus características moleculares del duplicado, Soto (2006)⁹ menciona la presencia de variedades duplicadas indica la existencia de un pequeño grado de sobreestimación de la diversidad genética, más aún cuando las 2 variedades provienen de la misma región y del mismo agricultor. En el inicio del grupo II (10%) se encuentra yuraq palta waña una accesión que se localiza por encima de 4200 msnm que se halla junto a las accesiones

murú chituriano e yuraq chituriano que son papas alargadas y el puquli. El grupo III constituye el 25% en la población muestreada donde destaca el runtus, macho huayro y puka huayro por variedades comerciales. El grupo IV y V están representados por una sola accesión yana imilla y puka murú winqus (2.5% cada uno), son papas nativas que se conservan en éstas áreas de cultivo con la finalidad de conservar la biodiversidad. El grupo VI conformado por qillu azul sunqu y punkina (5%) papas harinosas con un futuro promisorio bastante alto. En el grupo VII se reportan la gama de puka pinya, Gaspar y sarapalta (7.5%) son papas de forma tuberosado donde los dos primeros son similares en la forma de su tubérculo, siendo vistosos para los compradores y mantienen la exquisitez y buena calidad. El grupo VIII (2.5%) constituido por araq papa que son papas semisilvestres que se mantienen en campos de cultivo del maíz. Veramendi et al., (2013)⁶⁶, en estudio de “Integración de datos moleculares y morfológicos para la formación de la Colección Núcleo de Papa de Bolivia” encontraron una amplia diversidad genética entre las accesiones. Esto probablemente se debió a que en el primer caso el algoritmo de selección por su forma de proceder, dio mayor chance de selección a las accesiones más extremas, por tener éstas mayor contribución a la variabilidad general, y menor a las cercanas al baricentro, llegando estas últimas a ser sub-representadas. Al utilizar los microsatélites, éstos detectaron secuencias cortas de pares de base en el ADN, diferenciables entre accesiones, lo que confirió al análisis mayor precisión. Merino (2006)⁸⁶, en divergencia de loci microsatélites en papas silvestres y cultivadas, que en la experiencia en laboratorio coincide que a lo largo de las diferentes etapas del estudio observó que existen diferencias entre especies y entre loci en su capacidad de producir bandas fácilmente detectables, teniendo en cuenta la evolución de un microsatélite, se llega a la conclusión de que un sistema de SSRs tiene mayor probabilidad de funcionar en especies que descienden de un ancestro directo de la especie originaria, que en especies antecesoras a dicho ancestro. Cortez (2011)³⁹, al estudiar una colección de *Solanum tuberosum L. subsp. andígena Hawkes*, menciona alta diversidad por encontrar un grupo reducido de probables duplicados, encontró 4 grupos con una similitud mayor a 0,98 dentro de cada grupo en la colección original de 688 accesiones. Todos estos resultados guardan relaciones parecidas con resultados obtenidos en el presente trabajo. Orona (2004)¹²⁸, al evaluar en dos poblaciones la diversidad genética a través de los análisis RAPD y SSR en papa mostraron un porcentaje muy similar (46 y 42%) los marcadores RAPD, presentaron valores mas altos que los SSR para las dos localidades de origen, lo cual se considera normal debido a que se asume que SSR únicamente revela un solo locus, mientras que en el caso de los RAPD se asumió que cada banda pertenece a un locus distinto dada la naturaleza dominante de la técnica

que al unirse en forma aleatoria al genoma ocupa un locus individual (Milbourne *et al.*, 1997)⁶¹. Por otra parte, si se considera que la papa es una especie tetraploide (Milbourne *et al.*, 1997)⁶¹; Provan *et al.*, 1996)¹⁰⁷, entonces se puede asumir que un locus o alelo podría existir en cuatro formas distintas.

Del análisis de agrupamiento del dendrograma de la población de Seclla provincia de Angaraes región Huancavelica (figura 24), de relaciones entre las variedades usando coeficiente de similitud de Simple Matching y el método de Agrupamiento de UPGMA, del análisis de 74 marcadores microsatélites, se agruparon en ocho grupos las 39 muestras de papas (*Solanum spp.*) a una distancia de 0.70 unidades ultramétricas. El grupo I está integrado 25 accesiones (64.10%), es la más numerosa de ésta población donde destacan el yuraq wira pasña, camotillo, qatun huayro, peruanita, ritipa sisan, yuraq suytu y tumbay, todas ellas son papas nativas muy codiciados en el mercado. El grupo II comprende a tres accesiones challwa, yana muru winqus y qulluq (7.69%) que son cultivados para mantener la diversidad de estos cultivos. El grupo III a tres muestras compuesto por yuraq siri waña, araq papa y qaripa runtun (7.69%), el primero de los nombrados son papas netamente de altura, la segunda de los valles, es una variedad semisilvestre formalmente no se cultiva sus tubérculos se confunden con el suelo manteniéndose hasta la siguiente siembra de maíz generalmente, el tercero es una papa harinosa que lentamente está entrando al mercado. El grupo IV formado por una sola accesión kapkas (2.56%) variedad no muy conocida es muy distante genéticamente del resto de las muestras de la población de Seclla. El grupo V constituido por tres papas nativas yanawaqra, araqcha y puka araq papa (7.69%), son representantes netamente de papas nativas los dos primeros se encuentran juntos con los sembríos en las comunidades alto andinas y el último es uno de los representantes de las pas semisilvestres. El grupo VI constituido por un solo integrante el yana huayro cuya característica es ser harinosa y comercial, es una accesión que se encuentra en un extremo del cluster lejos genéticamente del qatun huayro que se encuentra en el primer grupo, así mismo no comparte familiaridad con los demás miembros de la población. El grupo VII y VIII constituidos por las accesiones waña que son papas amargas de alturas por encima de los 4200 msnm. Alvarado (2008)⁹⁷, corrobora nuestros resultados, mencionando que en la parte final del dendrograma se agrupan los cultivares de papas amargas encontrándose aisladas y distantes en similitud del resto de los cultivares nativos. Peñafiel *et al.*, (2007)⁹⁷, al evaluar la variabilidad del tomate de árbol (*Solanum betaceum Cav.*) hace referencia que el factor geográfico puede jugar también un papel determinante en los patrones de diversidad genética para ciertas especies vegetales, el aislamiento geográfico producido por la

fragmentación del hábitat ha propiciado la diferenciación genética entre poblaciones. Cadima et al., (2013)²⁹, visualiza las diferencias y relaciones genéticas entre especies y dentro de especies en cuanto a diversidad, asimismo muestran grupos genéticamente más similares, en conjunto la variabilidad genética en las especies de papa cultivada presente en Bolivia, es crucial para la asegurar la alimentación de los agricultores y las familias campesinas, ante una diversificación de ambientes y riesgos climáticos adversos de la región Andina. Estos materiales además, son fuente invaluable en la búsqueda constante de características importantes en el mejoramiento genético de la papa para las demandas actuales y futuras. Los dos autores coinciden con los resultados. Torres et al., (2012)¹⁹, menciona muchos estudios previos han reportado la construcción de mapas genéticos en papa, en diferentes poblaciones de mapeo y con diferentes marcadores moleculares. Sin embargo, para explotar completamente la información de los mapas genéticos es necesario que marcadores moleculares de diversos tipos sean integrados en un solo mapa, o incluso marcadores clásicos como morfológicos y enzimáticos, con la integración de mapas genéticos se incrementa la densidad de marcadores, mejora la resolución genética y crea un orden más confiable entre ellos^{74, 83}. Veramendi et al., (2013)⁶⁶, en uno de sus conclusiones menciona, “las implicaciones de conformar una buena colección núcleo es importante principalmente para que los fitomejoradores hagan un uso más apropiado y frecuente de esta rica variabilidad conservada, para buscar fuentes y genes valiosos de resistencia a factores abióticos, bióticos y de calidad, para luego incorporarlas y por selección generar nuevas variedades que se adapten al cambio climático, y garanticen la seguridad alimentaria. Mariette et al., (2017)¹⁴⁷, al estudiar la diversidad genética de papa (*Solanum tuberosum* L.) de Camerún revelados por marcadores de SSR, mencionan que los parámetros de diversidad genética dependen de los antecedentes genéticos de los materiales vegetales, la cantidad de genotipos y la cantidad de cebadores en estudio. El número promedio de alelos, PIC y los valores de diversidad genética observados en este estudio son indicativos de la riqueza de diversidad genética en variedades de papa de las tierras altas occidentales de Camerún.

4.3. Proceso de prueba de hipótesis

4.3.1. Perfiles moleculares de la diversidad genética de papa *Solanum spp.*

Hipótesis nula: Los perfiles moleculares no difieren entre la diversidad de papas (*Solanum spp.*), de los distritos de Secclla, Santo Tomás de Pata y Santillana.

Hipótesis nula: Los perfiles moleculares difieren entre la diversidad de papas (*Solanum spp.*) de los distritos de Secclla, Santo Tomás de Pata y Santillana.

4.3.2. Variabilidad de marcadores moleculares microsatélites

Hipótesis nula: No existe alta variabilidad en los marcadores moleculares microstaélites de la diversidad genética de papas (*Solanum spp.*), procedentes de los distritos de Secclla, Santo Tomás de Pata y Santillana.

Hipótesis alterna: Existe alta variabilidad en los marcadores moleculares microstaélites de la diversidad genética de papas (*Solanum spp.*), procedentes de los distritos de Secclla, Santo Tomás de Pata y Santillana.

4.3.3. Distancias genéticas de marcadores moleculares microsatélites

Hipótesis nula: Las distancias genéticas de los marcadores moleculares microstaélites de la diversidad genética de papas (*Solanum spp.*), procedentes de los distritos de Secclla, Santo Tomás de Pata y Santillana no son diferentes.

Hipótesis alterna: Las distancias genéticas de los marcadores moleculares microstaélites de la diversidad genética de papas (*Solanum spp.*), procedentes de los distritos de Secclla, Santo Tomás de Pata y Santillana son diferentes.

4.3.4. Prueba de hipótesis.

Las hipótesis planteadas es sustentado por AMOVA, además es corroborado por los resultados obtenidos en los análisis de marcadores microsatélites de la Secuencia Simple Repetida (SSR), realizado en el laboratorio de investigación en Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, por otra parte la presentación e interpretación de datos y la discusión de los resultados fundamentan del cumplimiento de las hipótesis planteadas.

Tabla 18. Análisis molecular de variancia (AMOVA) con dos componentes, del análisis de marcadores microsatélites de papas (*Solanum spp.*) procedentes de Santillana, Santo Tomás de Pata y Secclla.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Componentes de variancia	Porcentaje de variación	p-valor
Entre poblaciones	2	102.967	0.96652	Va	8.45
Dentro de poblaciones	125	1309.283	10.47427	Vb	91.55
Total	127	1412.250	11.44079		

$$F_{ST} = 0.08448$$

Tabla 19. Análisis molecular según F_{ST} , del análisis de marcadores microsatélites de papas (*Solanum spp.*) procedentes de Santillana, Santo Tomás de Pata y Secclla.

Población 1	Población 2	F_{ST}
SANTILLANA	SANTO TOMÁS DE PATA	0.054
SANTILLANA	SECCLLA	0.101
SANTO TOMÁS DE PATA	SECCLLA	0.101

En la tabla 18, se observa que el 91.55% de la variación procede de la variabilidad dentro de poblaciones, mientras que la variabilidad entre poblaciones es 8.45%, que se debe a la variabilidad en las frecuencias alélicas encontrada entre las tres poblaciones, es decir, que la variabilidad entre las poblaciones no es alta, además el parámetro que mide la diferenciación genética entre poblaciones, va de 0 (todas las poblaciones tienen exactamente las mismas frecuencias alélicas), a 1 (si tienen alelos completamente diferentes), más conocido como valor promedio del índice de fijación (F_{ST}) es de 0.08448, este valor nos indica que la diferenciación genética es moderada (tabla 7) entre las tres poblaciones, probablemente las poblaciones estudiadas geográficamente son bastante cercanas, aunque se observa en nuestros resultados grupos familiares por poblaciones.

La AMOVA es una técnica utilizada para estudiar las variaciones moleculares en el interior de una especie, en el presente trabajo se utilizó para comprobar el porcentaje entre poblaciones, dentro de poblaciones y variación individual dentro de las poblaciones. Las muestras se recogieron de tres distritos geográficamente distintos, este método muestra que existe una variación entre los integrantes de cada población (91.55%), que indica que existe grupos familiares o subpoblaciones en el interior de cada población y el 8.45% restante se debe al componente de varianza genética entre poblaciones. Estos resultados obtenidos se refuerza con la distancia e identidad genética de Nei, entre las poblaciones donde se indica que las tres poblaciones presentan mayores características en común, además los resultados que se muestran en tablas y figuras son sustentadas en la interpretación y discusión de los datos que fundamentan que las hipótesis han sido demostradas, demostrándose la existencia de los perfiles moleculares de la diversidad genética de *Solanum spp.*, variabilidad y distancias genéticas entre los marcadores moleculares microsatélites que contiene los objetivos del presente trabajo. Éstos resultados son respaldados por el trabajo de Ponce (2013)²⁵, Cuando se agrupó a las papas de las distintas localidades por regiones geográficas se obtuvo que la principal fuente de variación genética (89,47%) es debido a las diferencias dentro de las localidades de cada

región. De Haan *et al.*, (2010)¹³³ trabajando con papas nativas de Huancavelica donde al determinar el AMOVA entre dos regiones geográficamente distanciadas del centro y sur de Huancavelica y encontró que la principal fuente de variación genética se encontraba dentro de las poblaciones (colecciones in situ) locales que componían las regiones evaluadas, mientras la variación genética debida al agrupamiento por regiones y poblaciones dentro de las regiones fue limitada. Onamu R y Legaria J (2014)¹⁴³, en estudio de diversidad genética entre variedades de papa (*Solanum tuberosum* L.) cultivadas en México usando marcadores RAPD e ISSR, en el análisis de varianza molecular (AMOVA), usando agrupamiento jerárquico en base a origen, poblaciones, e individuos dentro de poblaciones, reveló diferencias genéticas significativas entre los tres grupos el 7 % de la variabilidad genética se puede atribuir a diferencias entre los grupos, la contribución más alta a la variabilidad genética total (62%) puede atribuirse al componente de la variación entre poblaciones dentro de grupos. En todas las comparaciones de grupos la mayor variación se debe a la fuente entre poblaciones dentro de grupos, lo que significa que entre variedades hay diferencias y que en menor grado se obtuvieron diferencias entre individuos dentro de poblaciones y la situación es similar para todas las comparaciones entre todos los grupos y la comparación entre los tres grupos. Los individuos dentro de las poblaciones contribuyeron con 31% de la variación genética. Estos resultados sugieren que los 'pool' genéticos europeos y mexicanos pueden ser de gran importancia para proveer materiales superiores a programas de mejoramiento genético. Mariette *et al.*, (2017)¹⁴⁷, al analizar la diversidad genética papa (*Solanum tuberosum* L.) en Camerún a través de marcadores moleculares microsatélite en tres tipos de accesiones, encuentra el AMOVA que muestra el 3% de las variaciones entre las ubicaciones, mientras que el 97%, de variación se debió a la diversidad dentro de la ubicación. Según la elevación, el 2% de la variación fue observada en varias variaciones, mientras que el 98% de la variación se debió a la diversidad dentro de la elevación. En relación con el tipo de variedad, se observó un 9% de la variación entre las diversas variables locales y variables varias indexadas, mientras que el 91% de la variación se debió a la diversidad dentro del tipo de variedad, resultados similares a los encontrados. Huaraca (2015)¹²⁷, investigando 138 accesiones de maca (*Lepidium meyenii* Walp), de la Meseta de Bombón colectados en los distritos de Óndores, Carhuamayo y Junín. Para ello, se generó ocho descriptores morfológicos de hipocótilos y se seleccionó cinco combinaciones de iniciadores de AFLP, encontrando el valor de AMOVA 95,71 por ciento, que indica, que la variación genética se encuentra entre las accesiones dentro de los distritos y sólo el 4,29 por ciento de la variación se explica por la variancia encontrada entre las accesiones de macas cultivadas en cada uno de los distritos. Las

investigaciones mencionadas corroboran resultados encontrados en el presente trabajo. Mesfin et al., (2016)¹⁴⁰, en la diversidad genética en cultivares de patata (*Solanum tuberosum*) con marcadores de repetición de secuencia simple (SSR), que el 92% de la variación fue observado dentro de la población, mientras que el 8% de variación entre poblaciones, que corrobora los resultados del trabajo. Pacheco (2015)¹³⁸, en la caracterización morfológica y molecular de mashua (*Tropaeolum tuberosum* ruiz & pavón) de los departamentos de Cusco y Cajamarca”, encuentra un valor de AMOVA entre poblaciones de 94.16%, entre distritos dentro de la cuenca 1.39% y entre cuencas hidrográficas 4.45%, que demuestra nuestros resultados que la variación se encuentra dentro de las poblaciones. Nuñez (2015)¹²⁴, en el análisis de la variabilidad genética de las ocas cultivadas (*Oxalis tuberosa* Mol) de la región Cajamarca, los resultados obtenidos en el AMOVA indican que una gran parte de la variación genética (96.66%) se origina por la variación encontrada dentro de las provincias región Cajamarca, es decir entre las accesiones de ocas cultivadas estudiadas, lo que permite pensar que no existe una estructura genética poblacional diferenciada entre provincias. Por otro lado sólo el 3.34 por ciento de la variación se explica por la variación encontrada entre las ocas cultivadas en cada una de las provincias, que concuerda con los resultados obtenidos.

Según tabla 19, se determinó los valores de fijación o F_{ST} , indica que la diferenciación genética entre las poblaciones de Santillana y Santo Tomás de Pata es de 0.054, mientras entre las poblaciones de Santillana – Secclla y Santo Tomás de Pata y Secclla es de 0.101, las tres relaciones se encuentran en diferenciación genética moderada, según la tabla 7. Resultados que argumentan la diferenciación genética entre las tres poblaciones es significativo, advirtiendo que los perfiles moleculares de la diversidad genética de *Solanum spp.*, variabilidad y distancias genéticas entre los marcadores moleculares microsatélites, justifican la veracidad y demostración de los objetivos planteados inicialmente. Mariette et al., (2017)¹⁴⁷, en diversidad genética papa (*Solanum tuberosum* L.) de Camerún a través de marcadores moleculares microsatélite en tres tipos de accesiones, encontraron el índice de diferenciación (F_{ST}) fue 0.018 entre ubicaciones, 0.0088 entre elevaciones y 0.039 entre variedades exóticas y locales, valores de diferenciación pequeña, que no concuerda con los resultados obtenidos. Estos resultados son apoyados por Condor (2013)¹³⁷, realizando “análisis de la variabilidad genética del olluco (*Ullucus tuberosus* Caldas) de tres comunidades campesinas de Cusco y dos comunidades campesinas de Huánuco”, en 175 accesiones utilizando marcadores moleculares AFLP, en el análisis de estructura genética poblacional encontró el índice de fijación genética $F_{ST} = 0.2871$, lo que indica que la diferenciación genética es muy grande entre las accesiones

de Cusco y Huánuco. Además dentro de las poblaciones de Cusco se observó evidencia de fijación alélica con un índice F_{ST} de 0.12967, mientras que en las poblaciones Huánuco no hay evidencia de fijación alélica ($F_{ST} = -0.02109$). Huaraca (2015)¹²⁷, al estudiar la “variabilidad genética de maca (*Lepidium meyenii* Walp) de la Meseta de Bombón – Junín, Perú”, en la caracterización morfológica y molecular de 138 accesiones de maca con el fin de estimar la variabilidad genética, colectados en los distritos de Óndores, Carhuamayo y Junín, empleando cinco combinaciones de iniciadores de AFLP, al realizar el análisis molecular con cinco combinaciones de primers generaron 187 bandas, encontrando el índice de fijación de $F_{ST} = 0,04295$, esto sugiere que la diferenciación genética entre los tres distritos es pequeña, pero presentan las colecciones variabilidad. Ambos investigadores encuentran variabilidad genética entre las poblaciones confirmando los resultados obtenidos. Pacheco (2015)¹³⁸, en la caracterización morfológica y molecular de mashua (*Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pavón) de los departamentos de Cusco y Cajamarca”, encuentra un valor para F_{ST} de 0,05839 nos muestra que solo existe una diferenciación moderada diferencia genética entre las mashuas dentro de los grupos de cada cuenca hidrográfica, que coincide con los resultados obtenidos en el presente trabajo. Nuñez (2015)¹²⁴, en el análisis de la variabilidad genética de las ocas cultivadas (*Oxalis tuberosa* Mol) de la región Cajamarca, al calcular el valor del índice de fijación o F_{ST} que representa el grado de diferenciación genética entre las provincias estudiadas en función de las frecuencias alélicas encuentra $F_{ST} = 0.0334$, valor menor a 0.05, esto sugiere que la diferenciación genética entre las cinco provincias es pequeña, siendo menor a los resultados del presente trabajo. Beovides (2015)¹³⁹, en accesiones cubanas de yuca (*Manihot esculenta* Crantz), al calcular F_{ST} entre países encuentra valores 0.0439 a 0.0605 donde predomina de 0.0513 a 0.0605 concordando con los resultados obtenidos.

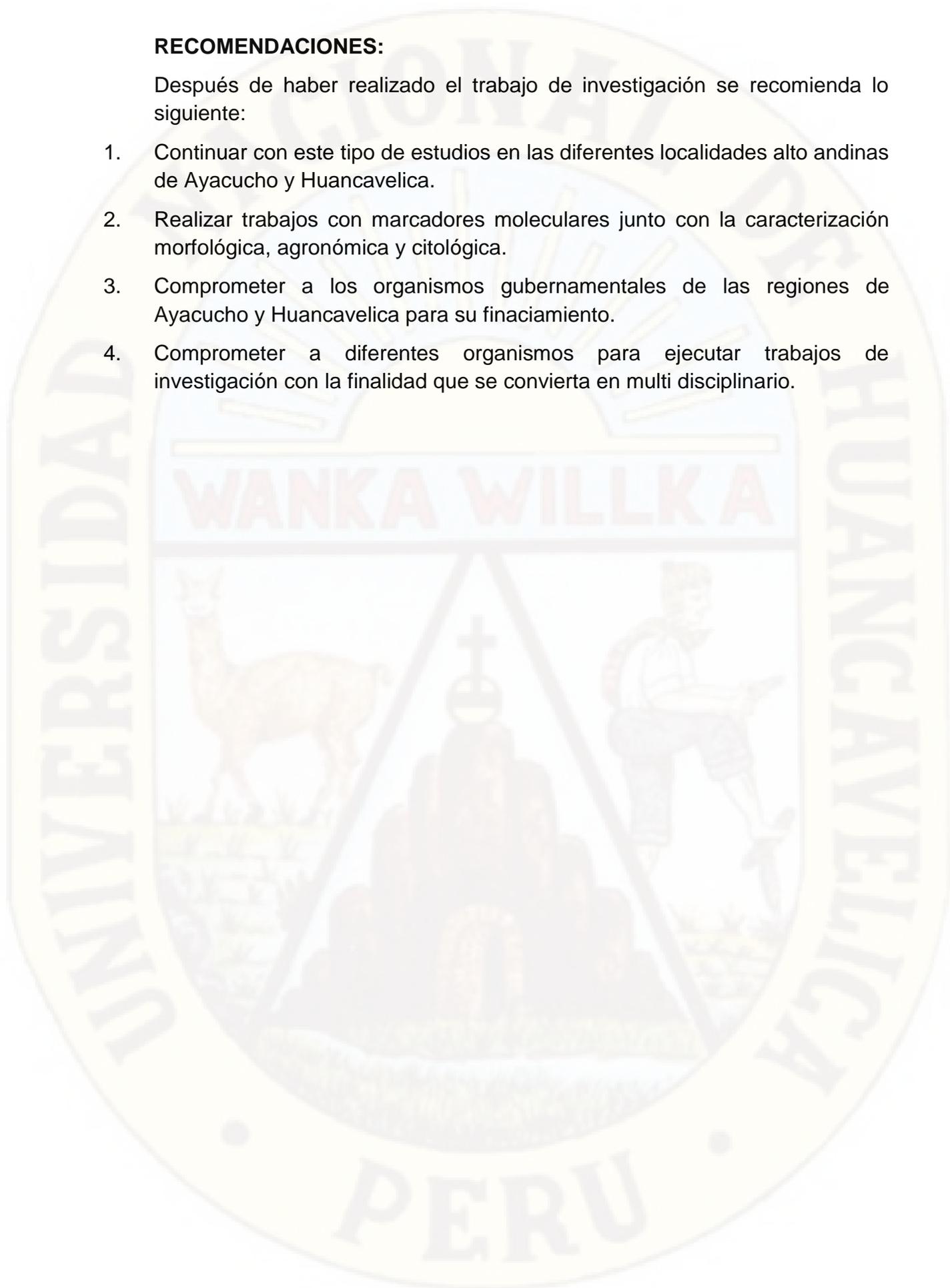
CONCLUSIONES:

1. Los perfiles moleculares de la diversidad genética de papas (*Solanum spp.*), varía de acuerdo a los iniciadores microsatélites que muestran mayor polimorfismo en una población, mientras en otras poblaciones muestran menor polimorfismo porque las muestras son diferente en accesiones y ploidia.
2. Los marcadores moleculares microsatélites utilizados demostraron ser eficientes en el análisis de la diversidad genética de accesiones de papas (*Solanum spp.*), formando en cada población de estudio grupos locales donde se diferencia claramente las variedades semisilvestres, nativas y las mejoradas.
3. Los mayores valores de distancia e identidad genética corresponden a los tres pares de poblaciones estudiadas, para Santillana y Santo Tomas de Pata le corresponde 0.986, Santillana y Seclla le corresponde 0.975 y Santo Tomas de Pata y Seclla le corresponde 0.976. Lo contrario ocurre con las mediciones de distancia genética, es decir los menores valores de distancia genética corresponden a pares de poblaciones más parecidas, en este caso son 0.015, 0.025 y 0.024 para cada par.
4. La heterocigosidad encontrada indica la alta variabilidad genética de las 128 accesiones, los dendrogramas y coordenadas principales muestran las diferencias genéticas formando grupos en la población total y dentro de las poblaciones, mostrando tendencia al agrupamiento por distritos de muestreo, se distingue accesiones cercanas como las papas mejoradas mariva, yungay y canchan, papas semisilvestres (araq papa) y papas amargas de altitudes mayores a 4200 msnm (Waña).
5. El resultado del AMOVA incluye el cálculo del estadístico $F_{ST} = 0.08448$ (grado de diferenciación génica entre las poblaciones). De acuerdo a este indicador existe una diferenciación genética moderada entre poblaciones, el mismo que se aprecia en la dispersión de coordenadas principales.

RECOMENDACIONES:

Después de haber realizado el trabajo de investigación se recomienda lo siguiente:

1. Continuar con este tipo de estudios en las diferentes localidades alto andinas de Ayacucho y Huancavelica.
2. Realizar trabajos con marcadores moleculares junto con la caracterización morfológica, agronómica y citológica.
3. Comprometer a los organismos gubernamentales de las regiones de Ayacucho y Huancavelica para su financiamiento.
4. Comprometer a diferentes organismos para ejecutar trabajos de investigación con la finalidad que se convierta en multi disciplinario.



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Colman L, Divito S, Digilio A, Monti M, Feingold S. Marcadores funcionales asociados al endulzamiento inducido por frío en papas nativas de Argentina. I Congreso Internacional de Investigación y Desarrollo de papas nativas. Quito. 2010. 10 al 16 de Marzo.
2. Navarro C, Bolaños L, Lagos T. Caracterización morfoagronómica y molecular de 19 genotipos de papa guata y chaucha (*Solanum tuberosum* L. y *Solanum phureja* Juz et Buk) cultivados en el departamento de Nariño. Revista de agronomía. 2010. Vol. XXVII No. 1 (pags. 27-39).
3. Hood L, Heath JR, Phelps ME, Lin, B. Systems biology and new technologies enable predictive and preventative medicine. Science. 2004. 306: 640–643.
4. Perazzo, G., A. Panta, F. Rodriguez, R. Gomez, J. Toledo, Z. Huaman, et al. Clonal true to type verification of potato accessions retrieved from *in vitro* conservation and cryopreservation. 2001. p. 175-183. In Scientist and farmer: Partners in research for the 21st century. International Potato Center (CIP). Lima (Peru).
5. Ghislain, M., F. Rodriguez, J. Nunez, P. Naik, Z. Huamán, and M. Bonierbale. Comparison of genetic diversity of potato varieties from India and South America. Poster presented at Plant and Animal Genome, San Diego, California, USA 2004. January 13-17. Available at <http://www.cipotato.org>.
6. Ghislain, M., F. Rodriguez, F. Villamon, J. Nunez, R. Waugh, and M. Bonierbale. Establishment of microsatellite assays for potato genetic identification. 2001. p. 167-174. In International Potato Center (CIP), Scientist and farmer: Partners in research for the 21st century. Program Report, 1999-2000. Lima, Perú.
7. Hawkes JG, The origin of *Solanum jusepckii* Buk and *Solanum curtilobum* Juz. et Buk. Z. Pflanzenzucht. 1962. 47: 1-14.
8. Estrada R. La Biodiversidad en el mejoramiento genético de la papa. PROINPA/CIA/CIP. Bolivia. 2000. Pag: 21-88.
9. Soto J. Análisis de la diversidad genética de papa nativa (*Solanum spp.*) de los departamentos de Ayacucho, Cajamarca, Cuzco, Huancavelica y Puno – Perú, mediante el uso de marcadores moleculares microsatélites. Tesis. UNMSM. 2006.
10. Hawkes, John Gregory. The potato: evolution, biodiversity and genetic resources. Londres. 1990: belhaven press.
11. Spooner D, Mcleant K, Ramsay G, Waught R, Bryant GJ. A single domestication for potato based on multilocus amplified fragment length polymorphism genotyping. - PNAS – 2005: October 11. Vol. 102 – N° 4. Pag: 14694–14699.
12. INCOPA. Buenas prácticas para el desarrollo de la cadena productiva de la papa: Experiencias con el proyecto INCOPA en el Perú. CIP. COSUDE. 2011. Lima – Perú.

13. Monteros C, Cuesta X, Jiménez J, López G. Las papas nativas en el Ecuador. Estudio cualitativo sobre oferta y demanda. INIAP. CIP. Quito Ecuador. 2005.
14. Instituto Nacional de Investigación y Extensión Agraria. Informe Final de cierre del Proyecto "Conservación In situ de cultivos nativos y sus parientes silvestres 2005". Ing. Llacsa, J. y Ing. Fernández, J. SUBDIRRGG-Estación Experimental Andenes. Cusco-Perú. 2005.
15. Instituto Nacional de Investigación y Extensión Agraria. Informe Final de cierre del Proyecto "Conservación In situ de cultivos nativos y sus parientes silvestres 2005". Ing. Altamirano, S. SUBDIRRGG-Estación Experimental. Canaán. Ayacucho-Perú. 2005.
16. Ayad WG, Hodgkin T, Jaradat A, Rao VR. Molecular genetic techniques for plant genetic resources (report of an IPGRI workshop, Rome, Italy). International Plant Resources Institute. Rome. 1997.
17. Ghislain M. International Potato Center Subproject Annual Progress Report. Reporting Period: January 1, 1999-December 31, Subproject title: DNA fingerprinting for the selection of a core collection of cultivated potato.
18. Ferreira M. Grattapaglia D. Introducción al uso de marcadores moleculares en el análisis genético. 1ed. EMBRAPA-CENARGEN. Brasilia. 1998. DF. pag: 55-62, 121-139.
19. Torres C, Sotil G, Orjeda G. Integración de marcadores microsatélites en el mapa ultradenso de *Solanum tuberosum* y su comparación con el de *Solanum phureja*. UNMSM, Facultad de Ciencias Biológicas E. A. P. de Genética y Biotecnología. Tesis. Lima – Perú. 2012.
20. Guzmán F, Miranda T, De La Cruz G, Peña G, Lozano R, Ponce O, Torres Y, Martínez D, Orjeda G. Avances en la caracterización molecular de las papas nativas del departamento de Ayacucho utilizando marcadores microsatelites. Universidad Peruana Cayetano Heredia – Facultad de Ciencias - Unidad de Genómica – Lima, Perú. I Congreso Internacional de Investigación y Desarrollo de Papas Nativas. Quito – Ecuador. 2010.
21. Gonzáles J, Peña G. Caracterización molecular de papas nativas (*Solanum* spp.) del distrito de Chungui, Ayacucho, mediante AFLP. Revista Peruana de Biología. 2014. vol.21 no.3 Lima.
22. Gamboa Y. Determinación de la diversidad genética mediante marcadores AFLPs en morfotipos de "papas nativas" del distrito de Anco, provincia La Mar- Ayacucho. Tesis para optar el título profesional de biólogo. UNSCH. 2011.
23. Tincopa L. Establecimiento de un índice de genes en *Ipomoea batatas* (L.) Lam. usando secuenciamiento 454 a partir de bibliotecas de cDNA y desarrollo de marcadores microsatélites. UNMSM. Facultad de Ciencias Biológicas. Unidad de Postgrado. Tesis de Magister en Biología Celular. 2010.
24. Martínez D. Ubicación de secuencias genómicas de *Solanum phureja* en un mapa genético utilizando marcadores microsatélites. UNMSM Facultad de

- Ciencias Biológicas E. A. P. de Genética y Biotecnología. Tesis. Lima – Perú. 2012.
25. Ponce R, Herrera M, Ramírez P. Caracterización molecular de las variedades de papas cultivadas (*Solanum spp.*) más importantes del Perú mediante el uso de microsatélites. UNMSM, Facultad de Ciencias Biológicas E. A. P. de Genética y Biotecnología. Tesis. Lima – Perú. 2013.
 26. Mathias M, Sagrego B, Kalazich J. Uso de Marcadores SSR para Identificación de Germoplasma de Papa en el Programa de Mejoramiento de INIA de Chile. Agric. Téc. v.67 n.1 Chillán. Temuco. Chile. 2007.
 27. Osorio M, Vegas A, Marques A, Gonzáles L. Condiciones para la amplificación de microsatélites en cultivares de papa. Agronomía Trop. 2011. 61(2): 159-165.
 28. Osorio M, González L, Suárez F. Diversidad de cultivares nativos de papa de la región andina venezolana, mediante microsatélites. Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas INIA. Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias CENIAP. 2012. Apdo. postal 2101. Uberlandia –MG- Brasil. XXV Congreso de la Asociación Latinoamericana de la papa.
 29. Cadima A, Veramendi S, Gabriel J. Uso de marcadores moleculares microsatélite para el análisis de la diversidad genética de papa nativa de Bolivia. 2013. Selva Andina Research Society.
 30. Spooner D, Salas A. Structure, biosystematics, and genetic resources. En: J. GOPAL, J. and KHURANA, P (edit). Handbook of potato production, improvement, and post-harvest management. New York: Haworth's Press. 2013. p. 1-39.
 31. Huamán Z. Systematic botany and morphology of the potato. Technical Information bulletin 6, International Potato Center. Lima, Perú. 1986.
 32. MINAG. (Ministerio de Agricultura). 2011. Disponible en <http://frenteweb.minag.gob.pe>.
 33. Atencio H. Diversidad en variedades andinas de papa (*Solanum tuberosum ssp. andigena*) evaluada con microsatélites. Tesis de Maestría en Manejo y Conservación de los Recursos Naturales para la Agricultura. UNMdp. Facultad de Ciencias Agrarias. 2011. 135 p.
 34. Quispe N, Farlie A. Análisis de la Cadena de Valor de la Papa Nativa en los Distritos de Huayana y Pomacocha –Provincia de Andahuaylas – Apurímac. Tesis para optar el Título de Magister en Biocomercio y Desarrollo Sostenible. 2013.
 35. FAOSTAT. Dirección de estadística FAO. En: <http://www.faostat.fao.org> (Ed.), 2012 mayo.
 36. Iriarte V, Condori B, Parapo D, Acuña D. Catálogo etnobotánica de papas nativas del Altiplano Norte de La Paz-Bolivia. Cochabamba, Bolivia. 2009; 142 pp.
 37. Juyó, D. Diversidad genética y estructura poblacional en genotipos diploides de papa. Universidad Nacional de Colombia Facultad de Agronomía. Bogotá, Colombia. 2012.

38. Rodríguez F, Folch C, Orena S, Kido A, Peña A, Kalazich J, Rojas J. Avances en la caracterización de las papas nativas de Chile. Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Osorno-Chile. Uberlandia –MG- Brasil. 2012. XXV Congreso de la Asociación Latinoamericana de la papa.
39. Cortez F. Construcción de una colección de núcleo de *Solanum tuberosum* L. *sussp. andígena* Hawkes conservada en el Banco Nacional de tubérculos y raíces andinas en base a marcadores morfológicos y moleculares. Universidad Mayor de San Simón. Tesis de posgrado para obtener el grado de maestría. Cochabamba – Bolivia. 2011
40. Gutiérrez R. Papas nativas desafiando el cambio climático. Primera edición. Intermediate Technology Development Group, ITDG. Lima – Perú. 2008.
41. Engel, F. A. Explorations of the Chilca Canyon, Peru. *Current Anthropol.* 1970. 11: 55-58.
42. Rodríguez, L. E. Origen y evolución de la papa cultivada, una revisión. *Agronomía colombiana*, 2010. 28(1), 9–17.
43. Sevilla y M. Holle. Recursos genéticos vegetales. Primera Edición. Luís león asociados S.R.L. Perú – Lima - La Molina. 2004, 140 pp.
44. Spooner, D.M. y W.L.A. Hettterscheid. Origins, evolution, and group classification of cultivated potatoes. En: Motley, T.J., N. Zerega y H. Cross (Eds.). *Darwin's harvest: new approaches to the origins, evolution and conservation of crops.* 2005. pp. 285-307. Columbia University Press, New York, NY.
45. Huamán Z. Conservación ex situ de papa; recursos genéticos en el CIP. Centro Internacional de la Papa. 1994. CIP circular vol. 20, N° 3. 2 – 7 pp.
46. Estrada N. La Biodiversidad en el Mejoramiento Genético de la papa. Bill Hardy, Emma Martinez (Ed.) La Paz, Bolivia. 2000, pp. 372.
47. Matsubayashi, M. Phylogenetic relationship in the potato and its related species. p. 93-118. En: Tsuchiya T. y P.K. Gupta (Eds.). *Chromosome engineering in plants: genetics, breeding, evolution.* 1991. Part B. Elsevier, Amsterdam.
48. Hawkes J.G. Origins of cultivated potatoes and species relationships. In: *Potato Genetics.* Centre for Agriculture and Biosciences CAB Internacional University Press UK Cambridge. 1994. Pp. 3-42.
49. Hawkes, J. Centros de Diversidad Genética Vegetal en Latinoamérica, ed. Es. Diversity Vol. 7 Nos. 1-2, 1994, pp. 7-8.
50. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO). Pérdida de la diversidad fitogenética. FAO-Sala de Prensa. 2004. <http://www.fao.org/newsroom/es/focus/2004/51102/article_51107es.html>. Acceso: 04/05/06.
51. CIP y FEDECCH. 2006. Catálogo de variedades de papa de Huancavelica – Perú. ISBN 92-9060-274-0.
52. Rojas P. Análisis de la diversidad genética de papas nativas (*Solanum sec. Petota*) de la comunidad de Chahuaytire, integrante del Parque de la Papa (Pisac-Cusco), y de las papas nativas repatriadas por el Centro Internacional

- de la Papa usando marcadores microsatélites. Tesis para optar el Título Profesional de Biólogo con mención en Microbiología y Parasitología. UNMSM. Lima-Perú. 2007.
53. Chávez P. La papa, tesoro de los andes. CIP. Avenida La Molina 1895, La Molina Apartado Postal 1558 Lima 12, Perú. 2008. www.cipotato.org
 54. Gabriel J. Estrategias y perspectivas del mejoramiento genético de papa (*Solanum tuberosum* L) en Bolivia. Fundación para la promoción e investigación de productos andinos (PROINPA). 2010. Disponible: proinpa@proinpa.org • www.proinpa.org
 55. Wilches A. Descripción de algunas herramientas moleculares y sus aplicaciones. Universidad Rafael Landívar. Guatemala. 2004. Serie técnica No. 15. Pp. 6-16.
 56. Anthony, F., Quirós, O., Philips, W. & Bertrand, B. Uso de los marcadores moleculares para la evaluación, la conservación y el uso de la diversidad genética. En CATIE, Actas de la 3^a. Semana Científica, Programa de Investigación, 3-5 de febrero 1997. (p. 267), Turrialba, Costa Rica.
 57. Muñoz T. Todo sobre la papa. Historia, secretos y recetas. CIP. EDELNOR S.A.A. Primera edición 2008. Pp. 8-42.
 58. Clausen A, Ispizúa N, Digilio. Conservation and Evaluation of an Endangered Genetic Resource: Native Andean Potato Varieties in Argentina. Argentinean Plant Science and Biotechnology I. The Americas Journal of Plant Science & Biotechnology. 2010: 3: 72-82.
 59. Mora F, Santos A, Scapim C. Mapeo de loci de caracteres cuantitativos (QTL) usando un enfoque multivariado. Ciencia e investigación Agraria. Centro de Ciencias Agrarias, Universidade Estadual de Maringá. Maringá, Paraná, Brasil. 2008.
 60. Moreno J, Cerón M, Valbuena R. Papas nativas colombianas. Catálogo de 60 variedades. Corpoica. 2009. 68 p.
 61. Milbourne, D., Meyer, R., Bradshaw, J.E., Baird, E., Bonar, N., Provan, J., Powell, W., and Waugh, R. Comparison of PCR-based markers systems for the analysis of genetics relationships in cultivated potato. Molecular breeding. 1997. 3: 127-136
 62. Ochoa C. Las Papas de Sudamérica: Perú. Centro Internacional de la papa (CIP). Lima. Perú. 1999.
 63. Sánchez M. Estudio de la variabilidad genética en accesiones de papa (*Solanum tuberosum* L) mediante marcadores SSRs. Revista Ciencia y Agricultura Vol. 14 (2). ISSN 0122-8420. 2017, pp. 67-76. Tunja (Boyacá) - Colombia.
 64. Salazar A, Sandoval A, Armendáriz J. Biología molecular fundamentos y aplicaciones en las ciencias de la salud. Mc Graw Hill. México. 2013.
 65. Jiménez L, Merchant H. Biología celular y molecular. Pearson Educación. Universidad Nacional Autónoma de México. 2003. Pp.6-84.
 66. Veramendi S, Cadima X, Gabriel. Integración de datos moleculares y morfológicos para la formación de la Colección Núcleo de Papa de Bolivia.

- Fundación PROINPA, Casilla 4285, 2013. Cochabamba, Bolivia. E-mail: j.gabriel@proinpa.org
67. Guzmán. F. Caracterización molecular y genética de los marcadores ligados al gen Ryadg del cromosoma XI de *Solanum tuberosum ssp indígena* y su aplicación en la identificación de nuevas fuentes de resistencia al virus PVY. Unidad de Postgrado. Tesis de Maestría. UNMSM. Lima. 2010.
 68. Sambrook J, Russell DW, Sambrook J. Molecular Cloning. 3Rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory. New York. 2001.
 69. Rogers SO, Bendich AJ. Extraction of DNA from plant tissues. Plant Molecular Biology Manual. 1988. A6: 1- 10. Kluwer Academic Publishers, Belgium.
 70. Dellaporta SL, Wood J, Hicks JB. A Plant DNA Minipreparation Version II. Plant Molecular Biology Reporter. 1983. 1 (4): 19-21.
 71. Doyle JJ, Doyle JL. Isolation of DNA from small amounts of plant tissues. BRL Focus 12: 1990. 13-15, modified at the Forest Biotechnology Lab at NCSU.
 72. Valadez E, Kahl G. Huellas de ADN en genomas de plantas teoría y protocolos de laboratorio. Universidad Autónoma de Chapingo. Mundi-Prensa México. 2000. Pp. 3-130.
 73. Collard BC, Jahufer MZ, Brouwer JB, Pang EC. An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement. 2005. Euphytica 142: 169-196.
 74. Cervera, m.; Cabezas, j.; Martínez, J. Análisis genético de la vid (en línea). Madrid, España. Consultado 1 ago. 2002. Disponible en http://www.rubes.es/ace/ciencia56_1.htm
 75. Ghislain, M., D.M. Spooner, F. Rodriguez, F. Villamón, J. Núñez, C. Vásquez, *et al.* Selection of highly informative and user-friendly microsatellites (SSRs) for genotyping of cultivated potato. Theor. Appl. Genet. 2004.108:881-890.
 76. Norero, N., M. Huarte, y S. Feingold. Potente herramienta para la identificación de cultivares de papa. Presentado como poster al V Simposio de Recursos Genéticos para América Latina y el Caribe, Mar del Plata, 10 a 14 noviembre 2003. Disponible en <http://www.inta.gov.ar>. Leído el 15 de octubre de 2004.
 77. Basantes M. Caracterización molecular de la colección nacional de camote (*Ipomoea* spp.) del Banco Nacional de Germoplasma del INIAP mediante marcadores microsatélites. 2012. Ingeniería en Biotecnología. Sangolquí. Ecuador.
 78. Azofeifa-Delgado, Álvaro Uso de marcadores moleculares en plantas; aplicaciones en frutales del trópico Agronomía Mesoamericana, vol. 17, núm. 2, julio-diciembre, 2006, pp. 221-241 Universidad de Costa Rica Alajuela, Costa Rica.

79. Ortiz, J.M., I. Aguinagalde, y J.P. Martín. Identificación varietal. Los marcadores genéticos en la mejora vegetal. Editorial de la UVP, Valencia, España. 2000.
80. Nuez, F.; Carrillo, J.M. (Eds.). Los marcadores genéticos en la mejora vegetal. Editorial Universidad Politécnica de Valencia. Valencia, España. 2000.
81. Powell, W.; Machray, G.C.; Provan, J. "Polymorphism revealed by simple sequence repeats." Trends in Plant Science. 1996; 1(7): 215-222.
82. Nuñez C, Rodríguez J, Nieto R y Barrientos A. Construcción de dendrogramas de taxonomía numérica mediante el coeficiente de distancia χ^2 : una revisión. Programa de Postgrado en Horticultura, Departamento de Fitotecnia, Universidad Autónoma Chapingo. Revista Chapingo Serie Horticultura. 2004. 10(2): 229-237.
83. Ghislain MJ, Núñez MR, Herrera DM, Spooner. The single Andigenum origin of *Neo-tuberosum-Tuberosum* potato materials is not supported by microsatellite and plastid marker analyses. Theor. Appl. Genet. 2009. 118(5), 963-969.
84. González S. Estudio de flujo de genes en quinua *Chenopodium quinoa* W.) en campo de agricultores mediante el uso de marcadores microsatélites. Escuela Politécnica del Ejército. Departamento de Ciencias de la Vida. Ingeniería en Biotecnología. Sangolquí – Ecuador. 2009.
85. Enríquez. M. Generación de Marcadores Moleculares en tomate de árbol (*Solanum betaceum* Cav. sin *Cyphomandra betacea* Sendt.) para estudios de diversidad genética de germoplasma ecuatoriano. Facultad de Ingeniería Mecánica y Ciencias de la Producción. Programa de Maestría en Biotecnología Agrícola. Tesis de Maestría. Guayaquil – Ecuador. 2011.
86. Merino C. Divergencia de loci microsatélites entre papas silvestres y cultivadas (Familia Solanaceae Género Solanum Sección Petota). UNMSM, Tesis para optar el título de Biólogo con mención en Biología Celular y Genética. Lima – Perú. 2006.
87. Contreras A. Análisis de la biodiversidad genética de variedades nativas de Chile "poblano" por medio de microsatélites. Colegio de postgraduados. Postgrado de de Recursos Genéticos y Productividad genética. Montecillo – México. 2011.
88. De La Cruz R. Buenas prácticas ambientales en el sistema de producción ladrillera para reducir impactos ambientales en Huachipa – Lima. Tesis para optar el grado de Doctor en Medio Ambiente y Desarrollo Sostenible. Universidad Nacional Federico Villarreal. 2011.
89. Brush, S. Ethnoecology, Biodiversity, and Modernization in Andean Potato Agriculture. En: Journal of Ethnobiology. 1992. Flagstaff. 12 (2), pp. 161-185.
90. Brush S. In Situ Conservation of Landraces in Centers of Crop Diversity. En: Crop Science. Madison. 1995. 35 (2), pp. 346-354.
91. Claverías R, Quispe C. Biodiversidad cultivada: una estrategia campesina para superar la pobreza y relacionarse con el mercado. En: Pulgar-Vidal, M;

- Zegarra, E; Urrutia, J. (Eds). Perú: el problema agrario en debate. Lima: Seminario Permanente de Investigación Agraria (SEPIA IX). 2002. pp. 180-204.
92. Pierri N, Foladori G. Una tipología del pensamiento ambientalista (eds.), ¿Sustentabilidad? Desacuerdos sobre el Desarrollo Sustentable. Montevideo. 2001.
 93. Zimmerman M, Baird J, Warren K, Clark J. Environmental Philosophy. From Animal Rights to Radical Ecology, Prentice-Hall Inc., Englewood Cliffs. New Jersey. 1993.
 94. González J, González O. "Environmental proactivity and business performance: An empirical analysis". Omega. 2005. Vol. 33, pp. 1-15.
 95. Sánchez S. Paradigmas y Contraste de Hipótesis. 1ra edición. CEPREDIM. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima. 2011.
 96. Taylor BH, Manhar JR, Amasino RM. Isolation and characterisation of plant DNAs. In: B.R. Glick; J.E. Thompson. (Eds.). Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology. CRC Press. Florida. 1993. p.37-47.
 97. Alvarado C. Caracterización fenotípica y molecular de la diversidad genética de papas cultivadas por su tolerancia al endulzamiento en frío. UNMSM. Tesis. Lima – Perú. 2008.
 98. CIP. Taller de análisis SSR en papa y desarrollo de bases de datos. Lima, Perú. Annual Report 2004. Centro Internacional de la Papa (CIP), Lima, Perú.
 99. Nei M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. 1978. Genetics 89: 583-590.
 100. Powell W, Machray G, Provan J. Polymorphism revealed by simple sequence repeats. 1996. Trends in plant science 1 (7): 215-222.
 101. Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. 1987. Mol Biol Evol 4:406–425.
 102. Ota T. Genetic Distance and Phylogenetic Analysis. Pennsylvania State University, University Park. 1993.
 103. Cribb, P.J. and J. G. Hawkes. Experimental evidence for the origin of *Solanum tuberosum* subspecies andigena. In W G. D'Arcy (ed.), Solanaceae: Biology and Systematics, 1986. 383-404. Columbia University Press, New York, NY, USA.
 104. Hosaka, K. T-type chloroplast DNA in *Solanum tuberosum* L. ssp. tuberosum was conferred by some populations of *S. tarijense* Hawkes. Amer. J. Potato Res. 2003. 80, 21-32.
 105. Huamán, Z., J.G. Hawkes y Rowe P.R. A biosystematic study of the origin of the diploid potato, *Solanum ajanhuiri*. Euphytica, 1982. 31, 665-675.
 106. Rodríguez, F., Ghislain, M., Clausen, A. M., Jansky, S. H., y Spooner, D. M. Hybrid origins of cultivated potatoes. TAG. Theoretical and applied genetics. Theoretische und angewandte Genetik, 2010. 121(6), 1187–98.

107. Provan, J., Powell, W., Waugh, R. Microsatellites analysis of relationships within cultivated potato (*Solanum tuberosum*). Theoretical and Applied Genetics. Springer – Verlag. 1996. 92: 1078 – 1084.
108. Benbouza H., Jacquemin J., Baudoin P & Mergeai G. Optimization of a reliable, fast, cheap and sensitive silver staining method to detect SSR markers in polyacrylamide gels. 2006. Biotechnol. Agron. Soc. Environ. 10 (2): 77-81
109. Peñafiel N, Arahana V y Torres M. Evaluación de la variabilidad genética del tomate de árbol (*Solanum betaceum* Cav.) en los cultivos de tres provincias del Ecuador por medio de marcadores microsatélites. Universidad San Francisco de Quito. 2007. Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales.
110. Blanco, F.; Cadete, J.; Pablos, J. Técnicas de investigación básica en reumatología. Editorial médica Panamericana. Buenos Aires. 2007.
111. Cubero, J. Introducción a la mejora genética vegetal. Madrid: Mundi-Prensa Libros. 2003.
112. Collard, B.C.Y., M.Z.Z. Jahufer, J.B. Brouwer & E.C.K. Pang. An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker assisted selection for crop improvement: The basic concepts. 2005. Euphytica 142, 169-196.
113. Onamu, R., Legaria-Solano, P., Sahagún-Castellanos. J., Rodríguez De La O, J., Pérez-Nieto, J. Diversidad genética entre variedades de papa (*Solanum tuberosum* L.) cultivadas en México. Universidad Autónoma Chapingo. Artículo Científico Rev. Fitotec. 2015. Mex. Vol. 38 (1): 7 - 15.
114. Suárez S. Estudio preliminar de la caracterización molecular por microsatélites de progenitores tipo Dura de palma de aceite (*Elaeis guineensis* Jacq.) Trabajo de Grado. Facultad de Química Industrial. Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales (U.D.C.A) y Corporación Tecnológica de Bogotá (C.T.B.). Bogotá. 2006. 90p.
115. Cadima-Fuentes X, Veramendi S y Angulo A. Comparación de niveles de diversidad genética de papa entre Centros de Agrobiodiversidad y la Colección Nacional de Bolivia. Revista Latinoamericana de la Papa 21. ISSN: 1853-4961. 2017. Pp. 73-92.
116. Pérez J. Evaluación de la diversidad genética de papas nativas (*Solanum tuberosum* L. ssp. *tuberosum* Hawkes) silvestres y cultivadas del sur de Chile, mediante el uso de marcadores microsatélites. Tesis de licenciatura en Agronomía. Universidad Austral de Chile, Valdivia – Chile. 2004. 68 p.
117. Soto J, Medina T, Aquino Y, Estrada. Diversidad genética de papas nativas (*Solanum* spp.) conservados en cultivares nativos del Perú. Rev. Peru. biol. 2014. Facultad de Ciencias Biológicas UNMSM. ISSN-L 1561-0837.
118. Ghislain M, Nuñez J, Herrera M, Pignataro J, Guzman F, Bonierbale M y Spooner D. Robust and highly informative microsatellite-based genetic identity kit for potato. Mol Breeding. 2009, (23) pp. 381-383. Doi 10.1007/s11032-008-9240-0.

119. Orona F, Pecina V, Rocha M, Parga V, Martínez de la Vega O y Almeyda I. Caracterización de variedades y líneas élite de papa (*Solanum tuberosum* L.) en México utilizando marcadores RAPD y SSR. 2004. Revista Internacional de Botánica.
120. Spooner D, Nuñez J, Trujillo G, Herrera MR, Guzman F, Ghislain M. Extensive simple sequence repeat genotyping of potato landraces supports a major reevaluation of their gene pool structure and classification. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2007. 104:19398–19403.
121. De Vicente M, Lopez C y Fulton T. El módulo de aprendizaje, Análisis de la Diversidad Genética Utilizando Datos de Marcadores Moleculares. IPGRI. Universidad Nacional La Molina. IGD, Cornell University. 2004.
122. Huamán Z. Catálogo nacional de papas nativas del Perú. PROBIOANDES. Lima – Perú. 2012.
123. Hart, D. y A. Clark. Molecular population genetics. 315-392. En: Avise, J. y J. Hamrick (Eds.). Principles of population genetics. Sinauer Associates, Massachusetts; 1997. 423 p.
124. Nuñez E. Análisis de la variabilidad genética de las ocas cultivadas (*Oxalis tuberosa* Mol.) de la región Cajamarca. UNALM. Tesis para optar el título de biólogo. Lima – Perú. 2015.
125. Ruiz X. Diversidad genética de cacao *Theobroma cacao* L. con marcadores moleculares microsatélites. Universidad Nacional de Colombia Facultad de Ciencias Agrarias Escuela de Posgrados Palmira - Colombia 2014.
126. Ghislain M, Núñez, J, Herrera M, Pignataro J, Guzman F, Bornierbale M, Spooner, D. Robust and highly informative microsatellite based genetic identity kit for potato. Molecular Breeding 23(3) 2008: 377-388.
127. Huaraca F. Variabilidad genética de maca (*Lepidium meyenii* Walp.) de la Meseta de Bombón – Junín, Perú. UNALM. Tesis para optar el grado de Magíster Scientiae en mejoramiento genético de plantas. Lima – Perú. 2015.
128. Orona F. Caracterización de germoplasma sobresaliente de papa *Solanum tuberosum* L. En México mediante RADP y SSR. Universidad Autónoma de Nuevo León. Tesis de doctorado en Ciencias con Especialidad en Biotecnología. San Nicolas De Los Garza. México. 2004.
129. Rohlf, F. NTSYS pc: Numerical taxonomy and multivariate system, ver. 2.1, computer program. Setakuet, New York: Exeter Publishing. 2000.
130. Crisci, J. y M. F. López Armengol. Introducción a la teoría y práctica de la taxonomía numérica. Monografía N° 26. Washington, Organización de Estados Americanos, 1983; 132 pp.
131. Excoffier L, Laval G, Schneider S. Arlequin version 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. Evol Bioinform Online. 2005; 1:47-50.
132. Yeh F, Boyle T, Xiyang J. POPGENE Version 1.31: Microsoft WindowBased Freeware for Population Genetic Analysis. Alberta: University of Alberta and Center for International Forestry Research; 1999.

133. De Haan S, Núñez J, Bonierbale M, y Ghislain M. Multilevel Agrobiodiversity and Conservation of Andean Potatoes in Central Perú. *Mountain Research and Development*, 2010. 30(3):222-231.
134. Aranguren-Méndez J, Román-Bravo R, Isea W, Villasmil Y, y J. Jordana J. Los microsatélites (STR's), marcadores moleculares de ADN por excelencia para programas de conservación: una revisión Facultad de Ciencias Veterinarias, La Universidad del Zulia. Apartado 15252, Maracaibo, Estado Zulia, Venezuela. 2005.
135. Hurtado E. El requerimiento del marco epistológico en las tesis de post grado. UNMSM. *Rev. de Investigación de la Fac. de Ciencias Administrativas*, Vol. 9. N° 17. Lima. 2006.
136. Roca L. "Análisis de la diversidad genética de papas nativas de la zona suroeste del departamento de Junín mediante el uso de marcadores moleculares microsatélites" tesis de pregrado UNALM. Facultad de Ciencias. Lima – Perú. 2015.
137. Condor R. "Análisis de la variabilidad genética del olluco (*Ullucus tuberosus* Caldas) de tres comunidades campesinas de Cusco y dos comunidades campesinas de Huánuco". Tesis para optar el grado de Magister Scientiae en mejoramiento genético de plantas. UNALM. Lima – Perú. 2013.
138. Pacheco E. "Caracterización morfológica y molecular de mashua (*tropaeolum tuberosum* ruiz & pavón) de los departamentos de cusco y cajamarca". Tesis para optar del grado de magister scientiae en mejoramiento genético de plantas. UNALM. Lima – Perú. 2015
139. Beovides Y. Caracterización de la variabilidad genética e identificación de marcadores moleculares asociados al porcentaje de materia seca en accesiones cubanas de yuca (*Manihot esculenta* Crantz). Tesis de doctorado en Ciencias Biológicas. Universidad La Habana. Editorial Universitaria, 2015. -- ISBN 959-16-2715-5.
140. Mesfin B, Mwangi S, Mehari T, Remmy W, Ghislain M and Magembe E. Genetic diversity assessment of farmers' and improved potato (*Solanum tuberosum*) cultivars from Eritrea using simple sequence repeat (SSR) markers. Department of Horticulture, Hamelmalo Agricultural College, Keren, Eritrea. Department of Horticulture, Jomo Kenyatta University of Agriculture and Technology, Nairobi, Kenya. International Potato Center (IPC) P.O. Box 25171, Nairobi 00603, Kenya. 2016.
141. Morillo A, Morillo Y, Tovar Y. Caracterización molecular de cubios (*Tropaeolum tuberosum* Ruíz y Pavón) en el departamento de Boyacá. *Revista de Ciencias Agrícolas*. 2016. 33(2): 32-42: doi: <http://dx.doi.org/10.22267,rcia.163302.50>.
142. Gamboa Y y Peña G. Diversidad genética de papas nativas (*Solanum* spp.) del distrito de Vilcashuamán, Ayacucho- Perú, mediante AFLP. Laboratorio de Biología Celular y Molecular – Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, Ayacucho-Perú. *Revista Peruana de Biología*. 2018. 25(3) doi:

<http://dx.doi.org/10.15381/rpb.v25i3.15209>.

143. Onamu R y Legaria J. Diversidad genética entre variedades de papa (*Solanum tuberosum* L.) cultivadas en México usando marcadores RAPD e ISSR*, Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas Vol.5 2014 p. 561-575.
144. Galani Y, Gupta P, Patel N, Shah A, Acharya R y Talati J. Caracterización de la papa india (*Solanum tuberosum* L.) variedades para endulzamiento inducida por frío utilizando marcadores de SSR. Revista de Ciencias de las Plantas. Vol. 3, No. 4, 2015, pp. 191 - 196. doi: 10.11648 / j.jps.20150304.14.
145. Hong L y Huachun G. Uso de SSR para evaluar la diversidad genética de cultivares de patata de la provincia de Yunnan (suroeste de China). Instituto de Investigación de Tubérculos y Cultivos, Universidad Agrícola de Yunnan, Kunming, R.R. China. 2014.
146. Song X, Zhang C, Li Y Feng, Yang Q and Huang S. SSR analysis of Genetic Diversity Among 192 Diploid Potato Cultivars. Horticultural Plant Journal. College of Life Science, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China. 2016.
147. Mariette A, Kouadio N, Bertrand E, Kanmegne G, Machuka E, Osama S, Nzuki I and Kamga. Diversidad genética y colección central para cultivares de papa (*Solanum tuberosum* L.) de Camerún revelados por marcadores de SSR. Departament of plant Biology, Faculty of Science, University of Dschang. Cameroon. 2017.



ANEXOS

MATRIZ DE CONSISTENCIA

Análisis de la diversidad de papas (*Solanum spp.*) con marcadores moleculares microsatélite de los distritos de Secclla y Santo Tomás de Pata (Huancavelica) y Santillana (Ayacucho)

Mg. Blg°. Saturnino Martín Tenorio Bautista

PROBLEMA	OBJETIVOS	HIPÓTESIS	VARIABLES	MARCO METODOLÓGICO	POBLACIÓN
<p>General</p> <ul style="list-style-type: none"> ¿Cuáles serán las características de marcadores moleculares microsatélite de la diversidad genética de papas (<i>Solanum spp.</i>) de los distritos de Secclla y Santo Tomás de Pata de la provincia de Angaraes - Huancavelica y distrito de Santillana de la provincia Huanta - Ayacucho? <p>Específicos</p> <ul style="list-style-type: none"> ¿Cuáles serán los perfiles moleculares de la diversidad genética de papas (<i>Solanum spp.</i>), procedentes de los distritos de Secclla, Santo Tomás de Pata y Santillana? ¿Cuál será la variabilidad en los marcadores moleculares microstaéлитes 	<p>Objetivo General.</p> <ul style="list-style-type: none"> Estudiar las características de marcadores moleculares microsatélite de la diversidad genética de papas (<i>Solanum spp.</i>) de los distritos de Secclla y Santo Tomás de Pata de la provincia de Angaraes - Huancavelica y distrito de Santillana de la provincia Huanta - Ayacucho. <p>Objetivos Específicos.</p> <ul style="list-style-type: none"> Determinar los perfiles moleculares de la diversidad genética de papas (<i>Solanum spp.</i>), procedentes de los distritos de Secclla, Santo Tomás de Pata y Santillana. 	<p>General</p> <p>Hi: Las variedades de papas (<i>Solanum spp.</i>) de los distritos Secclla, Santo Tomás de Pata y Santillana difieren en sus características de marcadores moleculares microsatélite por ser un carácter intrínseco.</p> <p>Específicos</p> <p>Hi: Los perfiles moleculares difieren entre las variedades de papa (<i>Solanum spp.</i>) de los distritos de Secclla, Santo Tomás de Pata y Santillana.</p> <p>Hi: Existe alta variabilidad en los marcadores moleculares microstaéлитes de la diversidad genética de papas (<i>Solanum spp.</i>)</p>	<p>Independiente:</p> <ul style="list-style-type: none"> Accesiones de papas (<i>Solanum spp.</i>) <p>Dependiente:</p> <ul style="list-style-type: none"> Perfil molecular basado en microsatélites. Variabilidad de marcadores moleculares microsatélites. Distancia genética de marcadores moleculares microsatélite. 	<p>Nivel de investigación:</p> <ul style="list-style-type: none"> Es una investigación descriptiva y correlacional. <p>Métodos de investigación:</p> <ul style="list-style-type: none"> Muestras de "tubérculos semilla". Siembra. Brotación y crecimiento. Muestra de folíolos jóvenes. Extracción del ADN Determinación de la calidad y concentración de ADN. Cuantificación del ADN. Selección de primers microsatélites. Reacción de la cadena de la polimerasa (PCR) 	<p>Población, muestra y muestreo:</p> <ul style="list-style-type: none"> La población en estudio está comprendida por la diversidad de papas existentes en los distritos de Secclla, Santo Tomás de Pata y Santillana. El tamaño de muestra para el estudio será de cinco plantas por variedad. El tipo de muestreo

<p>de la diversidad genética de papas (<i>Solanum spp.</i>), procedentes de los distritos de Secclla, Santo Tomás de Pata Santillana?</p> <ul style="list-style-type: none"> • ¿Cuáles serán las distancias genéticas entre los marcadores moleculares microstaélites de la diversidad genética de papas (<i>Solanum spp.</i>), procedentes de los distritos de Secclla, Santo Tomás de Pata Santillana? 	<ul style="list-style-type: none"> • Comparar la variabilidad de los marcadores moleculares microstaélites de la diversidad genética de papas (<i>Solanum spp.</i>), procedentes de los distritos de Secclla, Santo Tomás de Pata y Santillana. • Estimar las distancias genéticas entre los marcadores moleculares microstaélites de la diversidad genética de papas (<i>Solanum spp.</i>), procedentes de los distritos de Secclla, Santo Tomás de Pata y Santillana. 	<p>procedentes de los distritos de Secclla, Santo Tomás de Pata y Santillana.</p> <p>Hi: Las distancias genéticas de los marcadores moleculares microstaélites de la diversidad genética de papas (<i>Solanum spp.</i>) procedentes de los distritos de Secclla, Santo Tomás de Pata y Santillana son diferentes.</p>		<ul style="list-style-type: none"> • Electroforesis en geles de poliacrilamida. • Fijación, tinción y revelado de gel. • Lectura de alelos de SSR. • Presentación de resultados. • Discusión. 	<p>será el no probabilístico, es decir que los tubérculos serán elegidos por el investigador.</p>
---	---	--	--	--	---

Tabla 20. Frecuencia de bandas, Frecuencia de alelos estimados (p & q), tamaño de la muestra (N), número de alelos (Na), número de alelos efectivos (Ne), heterocigocidad esperada (He) e índice de información de Shannon'n (I), por grupos y población.

Santillana:

Locus	Tamaño de muestra	Frecuencia alélica (a)	Frecuencia alélica (A)	número de alelos observado	número de alelos efectivo	Diversidad genética de Nei	Índice de información de Shannon
	N	q	p	Na	Ne	He	I
STM-0037	49	0.8330	0.1670	2	1.3855	0.2782	0.4511
STM-0037	49	0.8690	0.1310	2	1.2949	0.2277	0.3883
STM-0037	49	0.9689	0.0311	2	1.0641	0.0603	0.1385
STM-0037	49	0.9689	0.0311	2	1.0641	0.0603	0.1385
STM-0037	49	0.9794	0.0206	2	1.0421	0.0404	0.1004
STM-0037	49	0.9897	0.0103	2	1.0207	0.0203	0.0572
STM-0037	49	0.9258	0.0742	2	1.1592	0.1374	0.2643
STM-0037	49	0.1429	0.8571	2	1.3243	0.2449	0.4101
STM-0037	49	0.9368	0.0632	2	1.1344	0.1185	0.2357
STI-0032	49	0.8330	0.1670	2	1.3855	0.2782	0.4511
STI-0032	49	0.7954	0.2046	2	1.4825	0.3255	0.5067
STI-0032	49	0.6999	0.3001	2	1.7245	0.4201	0.6110
STI-0032	49	0.7825	0.2175	2	1.5161	0.3404	0.5238
STI-0032	49	0.3499	0.6501	2	1.8347	0.4550	0.6474
STI-0032	49	0.9258	0.0742	2	1.1592	0.1374	0.2643
STI-0032	49	0.5345	0.4655	2	1.9905	0.4976	0.6908
STI-0032	49	0.9897	0.0103	2	1.0207	0.0203	0.0572
STI-0032	49	0.9897	0.0103	2	1.0207	0.0203	0.0572
STI-0032	49	1.0000	0.0000	1	1.0000	0.0000	0.0000
STG-0016	49	0.9476	0.0524	2	1.1102	0.0993	0.2055
STG-0016	49	0.9689	0.0311	2	1.0641	0.0603	0.1385
STG-0016	49	0.9476	0.0524	2	1.1102	0.0993	0.2055
STG-0016	49	0.8081	0.1919	2	1.4495	0.3101	0.4889
STG-0016	49	0.7954	0.2046	2	1.4825	0.3255	0.5067
STG-0016	49	0.7559	0.2441	2	1.5848	0.3690	0.5557
STG-0016	49	0.9583	0.0417	2	1.0868	0.0799	0.1733
STG-0016	49	0.3780	0.6220	2	1.8876	0.4702	0.6631
STG-0016	49	0.9794	0.0206	2	1.0421	0.0404	0.1004
STG-0016	49	0.9476	0.0524	2	1.1102	0.0993	0.2055
STG-0016	49	0.7559	0.2441	2	1.5848	0.3690	0.5557
STG-0016	49	0.9794	0.0206	2	1.0421	0.0404	0.1004
STM-5127	49	0.9476	0.0524	2	1.1102	0.0993	0.2055
STM-5127	49	0.7693	0.2307	2	1.5503	0.3549	0.5401
STM-5127	49	0.9689	0.0311	2	1.0641	0.0603	0.1385
STM-5127	49	0.6061	0.3939	2	1.9138	0.4775	0.6705
STM-5127	49	0.8081	0.1919	2	1.4495	0.3101	0.4889
STM-5127	49	0.7825	0.2175	2	1.5161	0.3404	0.5238
STM-5127	49	0.8330	0.1670	2	1.3855	0.2782	0.4511
STM-5127	49	0.7954	0.2046	2	1.4825	0.3255	0.5067
STM-5127	49	0.9897	0.0103	2	1.0207	0.0203	0.0572
STG-0001	49	0.9583	0.0417	2	1.0868	0.0799	0.1733
STG-0001	49	0.9794	0.0206	2	1.0421	0.0404	0.1004
STG-0001	49	0.8921	0.1079	2	1.2383	0.1924	0.3420
STG-0001	49	0.5714	0.4286	2	1.9600	0.4898	0.6829
STG-0001	49	0.5714	0.4286	2	1.9600	0.4898	0.6829
STG-0001	49	0.6701	0.3299	2	1.7926	0.4422	0.6341
STG-0001	49	0.4041	0.5959	2	1.9290	0.4816	0.6746
STG-0001	49	0.5345	0.4655	2	1.9905	0.4976	0.6908

STG-0001	49	0.8921	0.1079	2	1.2383	0.1924	0.3420
STG-0001	49	0.9689	0.0311	2	1.0641	0.0603	0.1385
STM-1106	49	1.0000	0.0000	1	1.0000	0.0000	0.0000
STM-1106	49	0.9476	0.0524	2	1.1102	0.0993	0.2055
STM-1106	49	0.7284	0.2716	2	1.6546	0.3956	0.5848
STM-1106	49	0.7954	0.2046	2	1.4825	0.3255	0.5067
STM-1106	49	0.6999	0.3001	2	1.7245	0.4201	0.6110
STM-1106	49	0.7284	0.2716	2	1.6546	0.3956	0.5848
STM-1106	49	0.8806	0.1194	2	1.2662	0.2102	0.3657
STM-1106	49	0.9897	0.0103	2	1.0207	0.0203	0.0572
STI-0012	49	0.9689	0.0311	2	1.0641	0.0603	0.1385
STI-0012	49	0.6547	0.3453	2	1.8254	0.4522	0.6445
STI-0012	49	0.9689	0.0311	2	1.0641	0.0603	0.1385
STI-0012	49	0.2474	0.7526	2	1.5934	0.3724	0.5595
STI-0012	49	0.9476	0.0524	2	1.1102	0.0993	0.2055
STI-0012	49	0.9689	0.0311	2	1.0641	0.0603	0.1385
STI-0012	49	0.4286	0.5714	2	1.9600	0.4898	0.6829
STI-0012	49	0.9583	0.0417	2	1.0868	0.0799	0.1733
STI-0012	49	0.9794	0.0206	2	1.0421	0.0404	0.1004
STM-1052	49	0.9689	0.0311	2	1.0641	0.0603	0.1385
STM-1052	49	0.5345	0.4655	2	1.9905	0.4976	0.6908
STM-1052	49	0.8452	0.1548	2	1.3545	0.2617	0.4310
STM-1052	49	0.3194	0.6806	2	1.7693	0.4348	0.6264
STM-1052	49	0.9689	0.0311	2	1.0641	0.0603	0.1385
STM-1052	49	0.7559	0.2441	2	1.5848	0.3690	0.5557
STM-1052	49	0.9258	0.0742	2	1.1592	0.1374	0.2643

Santo Tomas de Pata:

Locus	Tamaño de muestra	Frecuencia alélica (a)	Frecuencia alélica (A)	número de alelos observado	número de alelos efectivo	Diversidad genética de Nei	Índice de información de Shannon
	N	q	p	Na	Ne	He	I
STM-0037	40	0.9747	0.0253	2	1.0519	0.0494	0.1181
STM-0037	40	0.7246	0.2754	2	1.6643	0.3991	0.5886
STM-0037	40	0.9487	0.0513	2	1.1079	0.0974	0.2024
STM-0037	40	0.9487	0.0513	2	1.1079	0.0974	0.2024
STM-0037	40	0.9874	0.0126	2	1.0255	0.0248	0.0675
STM-0037	40	1.0000	0.0000	1	1.0000	0.0000	0.0000
STM-0037	40	0.9747	0.0253	2	1.0519	0.0494	0.1181
STM-0037	40	0.3873	0.6127	2	1.9033	0.4746	0.6675
STM-0037	40	0.9354	0.0646	2	1.1374	0.1208	0.2394
STI-0032	40	1.0000	0.0000	1	1.0000	0.0000	0.0000
STI-0032	40	0.7583	0.2417	2	1.5787	0.3666	0.5530
STI-0032	40	0.6708	0.3292	2	1.7910	0.4416	0.6336
STI-0032	40	0.8660	0.1340	2	1.3022	0.2321	0.3939
STI-0032	40	0.4183	0.5817	2	1.9480	0.4867	0.6797
STI-0032	40	0.8944	0.1056	2	1.2328	0.1889	0.3372
STI-0032	40	0.5916	0.4084	2	1.9350	0.4832	0.6763
STI-0032	40	0.9747	0.0253	2	1.0519	0.0494	0.1181
STI-0032	40	0.9747	0.0253	2	1.0519	0.0494	0.1181
STI-0032	40	0.9874	0.0126	2	1.0255	0.0248	0.0675
STG-0016	40	0.8660	0.1340	2	1.3022	0.2321	0.3939
STG-0016	40	0.8803	0.1197	2	1.2669	0.2107	0.3662
STG-0016	40	0.8515	0.1485	2	1.3386	0.2529	0.4202
STG-0016	40	0.9354	0.0646	2	1.1374	0.1208	0.2394
STG-0016	40	0.7246	0.2754	2	1.6643	0.3991	0.5886
STG-0016	40	0.6519	0.3481	2	1.8310	0.4538	0.6462

STG-0016	40	0.8367	0.1633	2	1.3761	0.2733	0.4452
STG-0016	40	0.3536	0.6464	2	1.8420	0.4571	0.6496
STG-0016	40	0.9618	0.0382	2	1.0794	0.0735	0.1623
STG-0016	40	0.9747	0.0253	2	1.0519	0.0494	0.1181
STG-0016	40	0.7906	0.2094	2	1.4951	0.3311	0.5132
STG-0016	40	0.9618	0.0382	2	1.0794	0.0735	0.1623
STM-5127	40	1.0000	0.0000	1	1.0000	0.0000	0.0000
STM-5127	40	0.6892	0.3108	2	1.7495	0.4284	0.6197
STM-5127	40	0.9487	0.0513	2	1.1079	0.0974	0.2024
STM-5127	40	0.5916	0.4084	2	1.9350	0.4832	0.6763
STM-5127	40	0.7746	0.2254	2	1.5366	0.3492	0.5337
STM-5127	40	0.8660	0.1340	2	1.3022	0.2321	0.3939
STM-5127	40	0.7246	0.2754	2	1.6643	0.3991	0.5886
STM-5127	40	0.7583	0.2417	2	1.5787	0.3666	0.5530
STM-5127	40	1.0000	0.0000	1	1.0000	0.0000	0.0000
STG-0001	40	1.0000	0.0000	1	1.0000	0.0000	0.0000
STG-0001	40	0.9220	0.0780	2	1.1681	0.1439	0.2740
STG-0001	40	0.9354	0.0646	2	1.1374	0.1208	0.2394
STG-0001	40	0.6325	0.3675	2	1.8688	0.4649	0.6576
STG-0001	40	0.6325	0.3675	2	1.8688	0.4649	0.6576
STG-0001	40	0.6708	0.3292	2	1.7910	0.4416	0.6336
STG-0001	40	0.5477	0.4523	2	1.9819	0.4954	0.6886
STG-0001	40	0.6124	0.3876	2	1.9038	0.4747	0.6677
STG-0001	40	0.8803	0.1197	2	1.2669	0.2107	0.3662
STG-0001	40	0.9618	0.0382	2	1.0794	0.0735	0.1623
STM-1106	40	0.9747	0.0253	2	1.0519	0.0494	0.1181
STM-1106	40	0.9874	0.0126	2	1.0255	0.0248	0.0675
STM-1106	40	0.7071	0.2929	2	1.7071	0.4142	0.6047
STM-1106	40	0.9618	0.0382	2	1.0794	0.0735	0.1623
STM-1106	40	0.5916	0.4084	2	1.9350	0.4832	0.6763
STM-1106	40	0.9220	0.0780	2	1.1681	0.1439	0.2740
STM-1106	40	0.8367	0.1633	2	1.3761	0.2733	0.4452
STM-1106	40	1.0000	0.0000	1	1.0000	0.0000	0.0000
STI-0012	40	0.9220	0.0780	2	1.1681	0.1439	0.2740
STI-0012	40	0.6708	0.3292	2	1.7910	0.4416	0.6336
STI-0012	40	0.7246	0.2754	2	1.6643	0.3991	0.5886
STI-0012	40	0.4743	0.5257	2	1.9947	0.4987	0.6918
STI-0012	40	0.9220	0.0780	2	1.1681	0.1439	0.2740
STI-0012	40	0.6519	0.3481	2	1.8310	0.4538	0.6462
STI-0012	40	0.8660	0.1340	2	1.3022	0.2321	0.3939
STI-0012	40	0.9354	0.0646	2	1.1374	0.1208	0.2394
STI-0012	40	0.9618	0.0382	2	1.0794	0.0735	0.1623
STM-1052	40	0.9618	0.0382	2	1.0794	0.0735	0.1623
STM-1052	40	0.6519	0.3481	2	1.8310	0.4538	0.6462
STM-1052	40	0.8367	0.1633	2	1.3761	0.2733	0.4452
STM-1052	40	0.4743	0.5257	2	1.9947	0.4987	0.6918
STM-1052	40	0.9618	0.0382	2	1.0794	0.0735	0.1623
STM-1052	40	0.7583	0.2417	2	1.5787	0.3666	0.5530
STM-1052	40	0.9220	0.0780	2	1.1681	0.1439	0.2740

Seclla:

Locus	Tamaño de muestra	Frecuencia alélica (a)	Frecuencia alélica (A)	número de alelos observado	número de alelos efectivo	Diversidad genética de Nei	Índice de información de Shannon
	N	q	p	Na	Ne	He	I
STM-0037	39	0.8771	0.1229	2	1.2749	0.2157	0.3727
STM-0037	39	0.8623	0.1377	2	1.3114	0.2375	0.4007
STM-0037	39	0.9608	0.0392	2	1.0815	0.0754	0.1655
STM-0037	39	0.9740	0.0260	2	1.0533	0.0506	0.1205
STM-0037	39	1.0000	0.0000	1	1.0000	0.0000	0.0000
STM-0037	39	1.0000	0.0000	1	1.0000	0.0000	0.0000
STM-0037	39	0.8771	0.1229	2	1.2749	0.2157	0.3727
STM-0037	39	0.3581	0.6419	2	1.8508	0.4597	0.6523
STM-0037	39	0.9199	0.0801	2	1.1729	0.1474	0.2791
STI-0032	39	1.0000	0.0000	1	1.0000	0.0000	0.0000
STI-0032	39	0.9871	0.0129	2	1.0261	0.0255	0.0690
STI-0032	39	0.8771	0.1229	2	1.2749	0.2157	0.3727
STI-0032	39	0.7679	0.2321	2	1.5538	0.3564	0.5417
STI-0032	39	0.5064	0.4936	2	1.9997	0.4999	0.6931
STI-0032	39	0.8771	0.1229	2	1.2749	0.2157	0.3727
STI-0032	39	0.6202	0.3798	2	1.8908	0.4711	0.6640
STI-0032	39	0.9473	0.0527	2	1.1109	0.0998	0.2063
STI-0032	39	0.9871	0.0129	2	1.0261	0.0255	0.0690
STI-0032	39	1.0000	0.0000	1	1.0000	0.0000	0.0000
STG-0016	39	0.7338	0.2662	2	1.6412	0.3907	0.5794
STG-0016	39	0.6794	0.3206	2	1.7720	0.4357	0.6273
STG-0016	39	0.8771	0.1229	2	1.2749	0.2157	0.3727
STG-0016	39	0.7338	0.2662	2	1.6412	0.3907	0.5794
STG-0016	39	0.9473	0.0527	2	1.1109	0.0998	0.2063
STG-0016	39	0.3203	0.6797	2	1.7711	0.4354	0.6271
STG-0016	39	0.9740	0.0260	2	1.0533	0.0506	0.1205
STG-0016	39	0.3203	0.6797	2	1.7711	0.4354	0.6271
STG-0016	39	0.9740	0.0260	2	1.0533	0.0506	0.1205
STG-0016	39	0.9608	0.0392	2	1.0815	0.0754	0.1655
STG-0016	39	0.8771	0.1229	2	1.2749	0.2157	0.3727
STG-0016	39	1.0000	0.0000	1	1.0000	0.0000	0.0000
STM-5127	39	0.9473	0.0527	2	1.1109	0.0998	0.2063
STM-5127	39	0.6794	0.3206	2	1.7720	0.4357	0.6273
STM-5127	39	0.9740	0.0260	2	1.0533	0.0506	0.1205
STM-5127	39	0.8321	0.1679	2	1.3879	0.2795	0.4526
STM-5127	39	0.4529	0.5471	2	1.9824	0.4956	0.6887
STM-5127	39	0.8165	0.1835	2	1.4279	0.2997	0.4767
STM-5127	39	0.4804	0.5196	2	1.9969	0.4992	0.6924
STM-5127	39	0.8473	0.1527	2	1.3491	0.2587	0.4273
STM-5127	39	0.9871	0.0129	2	1.0261	0.0255	0.0690
STG-0001	39	1.0000	0.0000	1	1.0000	0.0000	0.0000
STG-0001	39	0.9199	0.0801	2	1.1729	0.1474	0.2791
STG-0001	39	0.8006	0.1994	2	1.4689	0.3192	0.4995
STG-0001	39	0.5991	0.4009	2	1.9243	0.4803	0.6734
STG-0001	39	0.5547	0.4453	2	1.9763	0.4940	0.6872
STG-0001	39	0.9058	0.0942	2	1.2057	0.1706	0.3121
STG-0001	39	0.8165	0.1835	2	1.4279	0.2997	0.4767
STG-0001	39	0.5311	0.4689	2	1.9923	0.4981	0.6912
STG-0001	39	0.9740	0.0260	2	1.0533	0.0506	0.1205
STG-0001	39	1.0000	0.0000	1	1.0000	0.0000	0.0000
STM-1106	39	0.8623	0.1377	2	1.3114	0.2375	0.4007
STM-1106	39	1.0000	0.0000	1	1.0000	0.0000	0.0000

STM-1106	39	0.8006	0.1994	2	1.4689	0.3192	0.4995
STM-1106	39	0.8771	0.1229	2	1.2749	0.2157	0.3727
STM-1106	39	0.7511	0.2489	2	1.5973	0.3739	0.5612
STM-1106	39	0.8623	0.1377	2	1.3114	0.2375	0.4007
STM-1106	39	0.7511	0.2489	2	1.5973	0.3739	0.5612
STM-1106	39	0.9337	0.0663	2	1.1413	0.1238	0.2440
STI-0012	39	0.9740	0.0260	2	1.0533	0.0506	0.1205
STI-0012	39	0.9608	0.0392	2	1.0815	0.0754	0.1655
STI-0012	39	0.9608	0.0392	2	1.0815	0.0754	0.1655
STI-0012	39	0.5064	0.4936	2	1.9997	0.4999	0.6931
STI-0012	39	0.9337	0.0663	2	1.1413	0.1238	0.2440
STI-0012	39	0.9199	0.0801	2	1.1729	0.1474	0.2791
STI-0012	39	0.4804	0.5196	2	1.9969	0.4992	0.6924
STI-0012	39	0.7845	0.2155	2	1.5109	0.3382	0.5212
STI-0012	39	0.8916	0.1084	2	1.2397	0.1934	0.3433
STM-1052	39	0.9740	0.0260	2	1.0533	0.0506	0.1205
STM-1052	39	0.6202	0.3798	2	1.8908	0.4711	0.6640
STM-1052	39	0.9058	0.0942	2	1.2057	0.1706	0.3121
STM-1052	39	0.3203	0.6797	2	1.7711	0.4354	0.6271
STM-1052	39	0.9058	0.0942	2	1.2057	0.1706	0.3121
STM-1052	39	0.7679	0.2321	2	1.5538	0.3564	0.5417
STM-1052	39	0.9608	0.0392	2	1.0815	0.0754	0.1655

Población:

Locus	Tamaño de muestra	Frecuencia alélica (a)	Frecuencia alélica (A)	número de alelos observado	número de alelos efectivo	Diversidad genética de Nei	Índice de información de Shannon
	N	q	p	Na	Ne	He	I
STM-0037	128	0.8907	0.1093	2	1.2418	0.1947	0.3451
STM-0037	128	0.8218	0.1782	2	1.4142	0.2929	0.4686
STM-0037	128	0.9601	0.0399	2	1.0830	0.0766	0.1676
STM-0037	128	0.9641	0.0359	2	1.0743	0.0691	0.1545
STM-0037	128	0.9882	0.0118	2	1.0239	0.0234	0.0642
STM-0037	128	0.9961	0.0039	2	1.0079	0.0078	0.0257
STM-0037	128	0.9262	0.0738	2	1.1583	0.1367	0.2633
STM-0037	128	0.2848	0.7152	2	1.6874	0.4074	0.5974
STM-0037	128	0.9312	0.0688	2	1.1470	0.1281	0.2505
STI-0032	128	0.9361	0.0639	2	1.1360	0.1197	0.2377
STI-0032	128	0.8422	0.1578	2	1.3620	0.2658	0.4360
STI-0032	128	0.7448	0.2552	2	1.6134	0.3802	0.5680
STI-0032	128	0.8042	0.1958	2	1.4598	0.3150	0.4946
STI-0032	128	0.4190	0.5810	2	1.9488	0.4869	0.6800
STI-0032	128	0.9012	0.0988	2	1.2168	0.1782	0.3225
STI-0032	128	0.5785	0.4215	2	1.9519	0.4877	0.6808
STI-0032	128	0.9721	0.0279	2	1.0573	0.0542	0.1273
STI-0032	128	0.9842	0.0158	2	1.0320	0.0310	0.0811
STI-0032	128	0.9961	0.0039	2	1.0079	0.0078	0.0257
STG-0016	128	0.8570	0.1430	2	1.3248	0.2451	0.4104
STG-0016	128	0.8530	0.1470	2	1.3347	0.2508	0.4175
STG-0016	128	0.8961	0.1039	2	1.2289	0.1863	0.3336
STG-0016	128	0.8253	0.1747	2	1.4053	0.2884	0.4633
STG-0016	128	0.8196	0.1804	2	1.4200	0.2958	0.4721
STG-0016	128	0.5907	0.4093	2	1.9363	0.4836	0.6766
STG-0016	128	0.9251	0.0749	2	1.1609	0.1386	0.2662
STG-0016	128	0.3528	0.6472	2	1.8404	0.4566	0.6491
STG-0016	128	0.9722	0.0278	2	1.0571	0.0540	0.1269
STG-0016	128	0.9601	0.0399	2	1.0830	0.0767	0.1677

STG-0016	128	0.8037	0.1963	2	1.4611	0.3156	0.4953
STG-0016	128	0.9802	0.0198	2	1.0405	0.0389	0.0974
STM-5127	128	0.9639	0.0361	2	1.0748	0.0696	0.1554
STM-5127	128	0.7169	0.2831	2	1.6833	0.4059	0.5959
STM-5127	128	0.9641	0.0359	2	1.0743	0.0691	0.1545
STM-5127	128	0.6704	0.3296	2	1.7919	0.4419	0.6339
STM-5127	128	0.6894	0.3106	2	1.7490	0.4282	0.6196
STM-5127	128	0.8189	0.1811	2	1.4216	0.2965	0.4730
STM-5127	128	0.6917	0.3083	2	1.7437	0.4265	0.6178
STM-5127	128	0.7996	0.2004	2	1.4716	0.3205	0.5009
STM-5127	128	0.9921	0.0079	2	1.0158	0.0156	0.0459
STG-0001	128	0.9840	0.0160	2	1.0324	0.0314	0.0819
STG-0001	128	0.9433	0.0567	2	1.1198	0.1070	0.2178
STG-0001	128	0.8778	0.1222	2	1.2732	0.2146	0.3713
STG-0001	128	0.5989	0.4011	2	1.9246	0.4804	0.6734
STG-0001	128	0.5854	0.4146	2	1.9433	0.4854	0.6785
STG-0001	128	0.7421	0.2579	2	1.6201	0.3827	0.5708
STG-0001	128	0.5746	0.4254	2	1.9564	0.4889	0.6820
STG-0001	128	0.5578	0.4422	2	1.9736	0.4933	0.6864
STG-0001	128	0.9134	0.0866	2	1.1879	0.1582	0.2946
STG-0001	128	0.9761	0.0239	2	1.0488	0.0466	0.1127
STM-1106	128	0.9501	0.0499	2	1.1047	0.0948	0.1981
STM-1106	128	0.9760	0.0240	2	1.0491	0.0468	0.1132
STM-1106	128	0.7438	0.2562	2	1.6159	0.3812	0.5691
STM-1106	128	0.8723	0.1277	2	1.2867	0.2228	0.3821
STM-1106	128	0.6816	0.3184	2	1.7668	0.4340	0.6256
STM-1106	128	0.8297	0.1703	2	1.3939	0.2826	0.4564
STM-1106	128	0.8274	0.1726	2	1.3998	0.2856	0.4600
STM-1106	128	0.9759	0.0241	2	1.0494	0.0471	0.1137
STI-0012	128	0.9558	0.0442	2	1.0923	0.0845	0.1811
STI-0012	128	0.7530	0.2470	2	1.5924	0.3720	0.5590
STI-0012	128	0.8901	0.1099	2	1.2433	0.1957	0.3464
STI-0012	128	0.3972	0.6028	2	1.9189	0.4789	0.6719
STI-0012	128	0.9354	0.0646	2	1.1376	0.1209	0.2396
STI-0012	128	0.8549	0.1451	2	1.3299	0.2481	0.4141
STI-0012	128	0.5811	0.4189	2	1.9488	0.4869	0.6799
STI-0012	128	0.8982	0.1018	2	1.2238	0.1829	0.3290
STI-0012	128	0.9471	0.0529	2	1.1113	0.1002	0.2069
STM-1052	128	0.9682	0.0318	2	1.0655	0.0615	0.1408
STM-1052	128	0.5973	0.4027	2	1.9270	0.4811	0.6741
STM-1052	128	0.8610	0.1390	2	1.3147	0.2394	0.4032
STM-1052	128	0.3681	0.6319	2	1.8699	0.4652	0.6579
STM-1052	128	0.9475	0.0525	2	1.1106	0.0996	0.2059
STM-1052	128	0.7603	0.2397	2	1.5735	0.3645	0.5507
STM-1052	128	0.9353	0.0647	2	1.1378	0.1211	0.2398

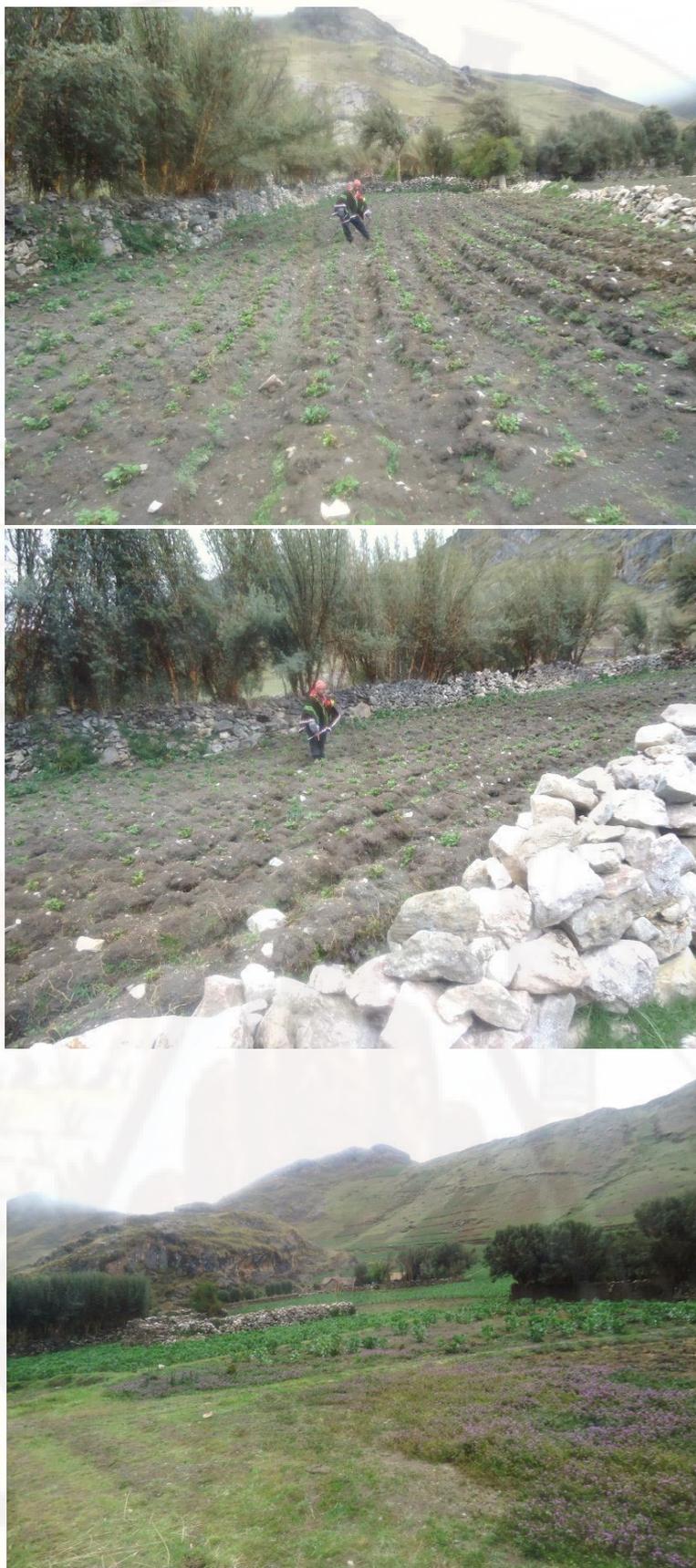


Figura 25. Campos de cultivo de papas (*Solanum spp.*) del distrito de Santillana provincia de Huanta región Ayacucho



Figura 26. Campos de cultivo de papas (*Solanum spp.*) del distrito de Santo Tomás de Pata provincia de Angaraes región Huancavelica



Figura 27. Campos de cultivo de papas (*Solanum spp.*) del distrito de Seclla provincia de Angaraes región Huancavelica



Figura 28. Las 128 accesiones de papas (*Solanum* spp.) procedentes de los distritos de Santillana, Santo Tomás de Pata y Seclla



Figura 29. Las 128 accesiones de papas (*Solanum* spp.) en plena brotación procedentes de los distritos de Santillana, Santo Tomás de Pata y Seclla





Figura 30. Evolución de algunas plantas de las 128 accesiones de papas (*Solanum spp.*) a los 39 días después de la siembra de accesiones procedentes de los distritos de Santillana, Santo Tomás de Pata y Secclla



Figura 31. Diferencias en su brotación y crecimiento de las 128 accesiones de papas (*Solanum spp.*) procedentes de los distritos de Santillana, Santo Tomás de Pata y Secclla



Figura 32. Plantas de algunas accesiones de papas (*Solanum spp.*) mostrando el haz y envés de las hojas antes del muestreo para la extracción de ADN procedentes de los distritos de Santillana, Santo Tomás de Pata y Seclla



Figura 33. Muestreo de las hojas más jóvenes de las 128 accesiones de papas (*Solanum spp.*) para la extracción de ADN procedentes de los distritos de Santillana, Santo Tomás de Pata y Seclla



Figura 34. Extracción, determinación de la calidad y concentración de ADN de las 128 accesiones de papas (*Solanum spp.*) procedentes de los distritos de Santillana, Santo Tomás de Pata y Seclla

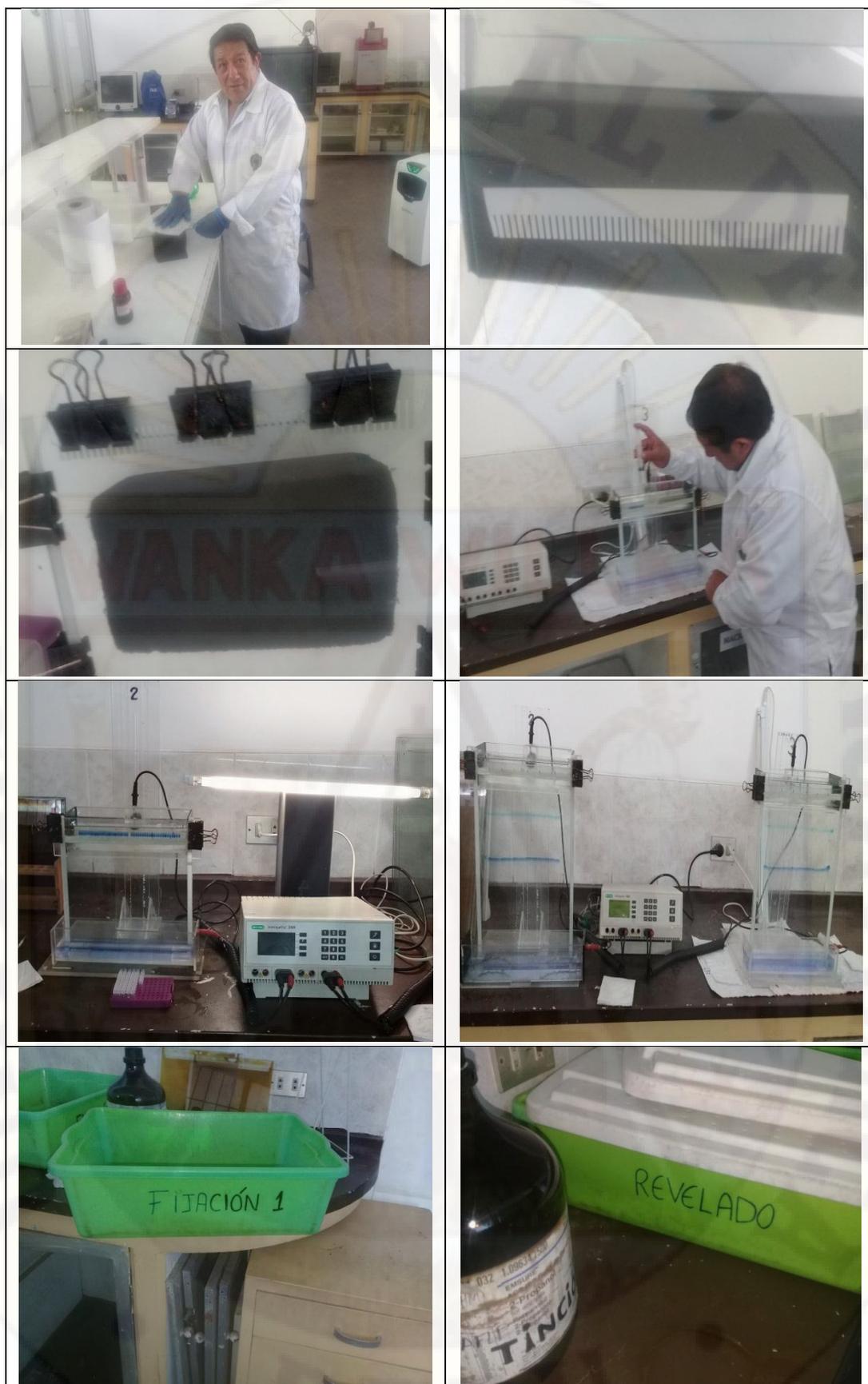


Figura 35. Proceso de corrido de ADN en gel de poliacrilamida, fijación, tinción y revelado de los alelos de SSR de las 128 accesiones de papas (*Solanum spp.*) procedentes de los distritos de Santillana, Santo Tomás de Pata y Seclla



Figura 36. Lectura de los alelos de SSR de las 128 accesiones de papas (*Solanum spp.*) procedentes de los distritos de Santillana, Santo Tomás de Pata y Seclla