

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

E.A.P. DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**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 micro satelitales**

TESIS para optar el Título profesional de: BIÓLOGO CON MENCIÓN EN BIOLOGÍA CELULAR Y
GENÉTICA

Julián Vicente Soto Torres

LIMA – PERÚ 2006

El hombre encuentra a
Dios detrás de cada puerta
que la ciencia logra abrir.
Albert Einstein

Las cosas son parecidas,
por eso la ciencia es
posible. Las cosas son
diferentes, por eso la
ciencia es necesaria.

El presente trabajo de tesis titulado: **“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”** ha sido realizado en el Instituto Nacional de Investigación y Extensión Agraria – INIEA de la Dirección de Investigación Agraria – DIA en la Sub dirección de Recursos Genéticos y Biotecnología – SUBDIRGEB, en el Centro Experimental La Molina - Lima, dentro del marco del Proyecto **“Conservación *in situ* de los cultivos nativos y sus parientes silvestres”**, con el apoyo financiero del Fondo Mundial para el Medio Ambiente – FMAM, la Cooperación Italiana y el Gobierno Peruano, bajo el asesoramiento del Ing. Tulio Medina Hinostroza.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres Elva y Cesar por cuidarme, por brindarme su apoyo y confianza en todo momento y por darme el mejor ejemplo de perseverancia. A mis hermanos Carlos, Raquel, Cesar, Yasmín, Kathia, Cristina y Diana por formar siempre parte de mi vida y a mis abuelos que han sido un ejemplo de vida.

A todo el personal de la Sub dirección de Recursos Genéticos y biotecnología del INIEA por haberme tratado como un colega más y hacer mi estancia muy grata. Al Ing. Tulio Medina y a la Ing. Agripina Roldan coordinadores del Proyecto *In situ*, por darme la oportunidad de realizar este trabajo y a los biólogos Emma Rivas y José Olivera por acogerme en el Laboratorio de Biología Molecular.

A mis amigos y colegas del Laboratorio de Biología Molecular: Yeny Aquino, Nedy Aguilar, Eudocio Veli y Rocío Silvestre; por sus enseñanzas, consejos, ayuda y compañía. A Iris Tenazoa por su gran ayuda en el laboratorio y a todos los practicantes que en algún momento ayudaron en mi trabajo.

A mi asesor el Dr. Álvaro Marcelo por su apoyo en este trabajo y a mis profesores de la Orientación de Biología Celular y Genética de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos por compartir sus enseñanzas y experiencias.

A los biólogos Genoveva Rossel, Cinthya Zorrilla, Percy Rojas y al Ing. Alberto Salas del Centro Internacional de la Papa, por sus consejos y ayuda.

A mis amigos de la universidad: Ronald Robles, Luis Flores, Yaqov Quinteros, Raúl Ortiz, Miler Pumapillo y Cesar Valladarex por todos los gratos momentos vividos y porque cada uno de ustedes ha forjado una parte de la persona que soy ahora. Y un agradecimiento muy especial a Heidi Del Águila por enseñarme a ver la vida con felicidad.

I. RESUMEN

La papa (*Solanum spp.*) tiene una gran importancia alimenticia y es de gran utilidad en el mejoramiento genético, esta representado por 8 especies cultivadas y alrededor de 200 especies silvestres con gran diversidad de caracteres. El “Proyecto de Conservación *In Situ* de los cultivos nativos y sus parientes silvestres” se viene desarrollando como respuesta a la amenaza latente de pérdida de la diversidad genética y busca fortalecer la conservación de las especies nativas más importantes en las chacras de los campesinos. Una de las primeras acciones ha sido inventariar y caracterizar la diversidad y variabilidad de los cultivos priorizados. Para el caso de la papa, los inventarios y el uso de marcadores morfológicos han demostrado un alto grado de diversidad genética mantenida por los agricultores andinos, sin embargo, debido a que estas características morfológicas son afectadas por el ambiente se hace necesario corroborar los resultados obtenidos mediante otras técnicas que no se encuentren bajo la presión ambiental.

Por tal motivo, se decidió analizar el grado de diversidad genética presentada en una muestra aleatoria de 79 variedades nominales de papa nativa (*Solanum spp.*) procedente de cinco zonas del Perú (Ayacucho, Cajamarca, Cuzco, Huancavelica y Puno) cultivadas en las chacras de los agricultores que forman parte del Proyecto de “Conservación *In situ* de los cultivos nativos y sus parientes silvestres”, mediante el uso de 18 marcadores moleculares microsatélites-SSR

Los microsatélites son secuencia cortas de di, tri o tetranucleótidos que están distribuidas en tandem a lo largo del genoma, siguen una herencia mendeliana, no son afectados por factores ambientales, son de carácter codominante y tienen un alta tasa polimórfica. Las secuencias son detectadas mediante PCR con el uso de iniciadores específicos, separación en geles de poliacrilamida y tinción con plata.

Los análisis de agrupamiento, riqueza alélica y análisis de diversidad genética realizados a partir de los datos obtenidos de 19 locus microsatélites registrados, demostraron el alto grado de diversidad genética que presenta la muestra colectada y corrobora los resultados obtenidos en el proyecto *In situ*. Además la comparación de la riqueza alélica mantenida por cada región de colecta hace presumir que existe un flujo génico constante entre estos lugares.

II. INTRODUCCION

La papa es uno de los cultivos de mayor importancia alimenticia, superior a todos los otros cultivos en la producción de proteínas, por unidad de tiempo y superficie, y en la producción de energía. Ocupa el quinto lugar en consumo humano y el cuarto lugar en cuanto a valor de producción mundial, después del arroz y maní (Horton, 1992).

La papa posee los mayores recursos genéticos conocidos para un cultivo, tiene alrededor de 200 especies silvestres con gran diversidad de caracteres y con la ventaja de poder incorporarlos en cultivares mediante cruzamientos y manipulaciones genéticas. Por otra parte, la riqueza enorme del germoplasma cultivado de los Andes está representado por ocho especies cultivadas en una serie poliploide ($2n=24, 36, 48$ y 60), que incluye unas 4000 variedades, además su alto potencial genético para el rendimiento y su amplia adaptabilidad bajo diferentes climas lo hace un cultivo muy valioso para contribuir a solucionar los problemas de la alimentación (Estrada, 2000). Debido a estas características, en los últimos años ha aumentado el interés de las especies de papa nativa por su potencial en la agrobiodiversidad, mejorando variedades comerciales, contrarrestando plagas e inclusive en el mercado industrial y farmacéutico. Este interés se ve incrementado debido a la amenaza latente de pérdida de diversidad y variabilidad conocido como “erosión genética” que pueden sufrir los cultivos andinos. El factor principal de esta erosión es la presión cultural ejercida sobre los pueblos andinos, que ha conllevado a cambiar muchos de sus hábitos de siembra, el desplazamiento de sus cultivos tradicionales por variedades más comerciales, poca valoración en el mercado de sus productos, la migración de la población joven hacia las capitales, la alta infección por virus y mayor presión de las plagas y enfermedades (INIEA, 2005 a-e; Huamán, 2002a).

Son los campesinos los principales conservadores de estas variedades nativas en forma tradicional, práctica que tiene origen desde tiempos preincas. De esta manera conservan en sus tierras de cultivo la mayor cantidad de variedades posible para afrontar los riesgos del clima, enfermedades y parásitos, y así, asegurar su fuente de alimento (Tapia, 1998).

La falta de un plan de contingencia para evitar esta pérdida y de apoyo hacia los pueblos andinos que mantienen de manera tradicional estos cultivos, hace que la pérdida de muchas variedades de papa y otros cultivos andinos, de gran potencial genético, sea irremediable.

Para afrontar estos problemas, en el año 2001 se implementó el Proyecto de “Conservación *In Situ* de los cultivos nativos y sus parientes silvestres” el cual busca fortalecer la conservación de las especies nativas y sus parientes silvestres en y alrededor de las chacras, los factores que lo hacen posible y elevar el nivel de conciencia sobre su valor biológico, cultural y nutricional en el ámbito local y nacional (INIEA, 2005 a-e).

Para comprender la dinámica de la conservación *in situ*, es necesario conocer la taxonomía de las especies a conservar, la descripción morfológica, citológica, fisiológica y genética para definir las relaciones intra e interespecíficas, así como, es indispensable la clasificación intraespecífica para planificar estrategias de conservación *in situ* (Sevilla, 2004).

Los inventarios y la caracterización de la diversidad y variabilidad genética conservada *in situ* de los cultivos priorizados, complementado con los mecanismos de intercambio de semillas, son los sustentos científicos más importantes para demostrar el alto grado de diversidad genética conservado por los campesinos en sus chacras. Así mismo, ayuda a justificar un cierto nivel de protección por parte del Estado en los aspectos culturales y biológicos (INIEA, 2005 a-e).

Por tal motivo, se consideró necesario respaldar los resultados obtenidos de la caracterización de dichos cultivos, en especial del cultivo de la papa, mediante el uso de otras técnicas que pudieran determinar el grado de diversidad que presenta este cultivo.

El uso de técnicas moleculares fue elegido para este trabajo, debido a que no son afectadas por la presión del ambiente y dan una información genotípica más completa. Se decidió usar los marcadores microsatélites, por ser más informativos para estudios genético poblacionales, por su característica genética codominante, su alto grado de polimorfismo, su fácil reproducibilidad y por la existencia de protocolos estandarizados por el Centro Internacional de la Papa. (CIP, 1997; Ghislain, 2001)

El presente trabajo tiene como finalidad analizar el grado de diversidad genética que presenta una muestra aleatoria de 79 variedades nominales de papa nativa (*Solanum* spp.) procedente de cinco zonas del Perú: Ayacucho (comunidad de Huayllay y Qochapunco), Cajamarca (comunidad de El Lirio), Cuzco (comunidad de Pacchanta), Huancavelica (comunidad de Antacocha), y Puno (comunidad de Huancani) de agricultores que forman parte del Proyecto de Conservación *In situ*, mediante el uso de marcadores microsatélites -SSR

El presente trabajo se llevó a cabo íntegramente en el Laboratorio de Biología Molecular de la Sub dirección de Recursos Genéticos y Biotecnología – SUDIRGEB del Instituto Nacional de Investigación y Extensión Agraria - INIEA.

III. ANTECEDENTES

3.1 La papa (*Solanum* spp.)

3.1.1 Generalidades

La familia Solanaceae contiene varias especies cultivadas de gran importancia económica, tales como el tomate (*Lycopersicon esculentum*), la berenjena (*Solanum melongena* L), el tabaco (*Nicotiana tabacum*), el pimiento (*Capsicum annum*) y la papa (*Solanum tuberosum*).

El genero *Solanum*, al cual pertenece la papa, consiste de aproximadamente 2800 especies, de las cuales 216 presentan o forman tubérculo, siendo 209 silvestres y 8 cultivadas (Hawkes, 1990). Todas tienen el mismo número base de cromosomas ($x = 12$), y están presentes en series poliploides, desde diploides ($2n = 2x = 24$) hasta hexaploides ($2n = 6x = 72$) (Hawkes, 1994). Tiene amplia adaptabilidad bajo diferentes climas que van desde los altiplanos entre los 2000 a 4000 m.s.n.m. hasta las zonas bajas o valles de la zona tórrida (intratropicos), desde 1000 a 2000 m.s.n.m. Una vez introducida en regiones nuevas, es relativamente fácil adaptarla a los sistemas de cultivo y rotación (Estrada, 2000).

La papa fue domesticada hace 10,000 años en el altiplano, al sureste de Perú y noreste de Bolivia, según análisis con carbono 14. No se conoce con exactitud la especie silvestre que originó las especies cultivadas diploides, y lo más probable es que esta especie haya desaparecido al cruzarse con otras especies semicultivadas o silvestres (Grun, 1990).

Las especies cultivadas de la papa se distinguen de sus silvestres relativos por las siguientes características: las cultivadas llevan tubérculos agradables al paladar, los tubérculos forman grupos alrededor de la base, son de gran tamaño y numerosos. Al parecer la selección humana se dirigió hacia los tubérculos más agradables, de mayor tamaño, de gran producción y de rápida cosecha. Estas tres características son comunes en las ocho especies de papas cultivadas incluyendo las dos subespecies, a pesar del extremo polimorfismo que existe entre ellas (Matsubayashi, 1991).

3.1.2 Origen y evolución de las especies de papa cultivada

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 Bolivia; por consiguiente la papa se dispersó al centro y norte del Perú, alcanzando por el norte hasta Colombia y por el sur hasta Chile.

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 (Hawkes, 1990, Spopper y col, 2005).

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 cultivadas (Hawkes, 1962). 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 y se puede decir con certeza que este cultivo ha sido la base de las civilizaciones y culturas andinas (Estrada, 2000).

Diversos estudios citológicos indican que la evolución de las papas cultivadas ha sido en la dirección diploide a pentaploide. Esto debido a la presencia de un número básico $x = 12$, presente tanto en especies cultivadas como en silvestres, la existencia de una serie poliploide de especies, desde diploides hasta pentaploides y la presencia de especies diploides tanto silvestres como cultivadas. Bajo este concepto las diploides serían las más primitivas y las pentaploides las más recientes (Vasquez, 1988).

Según Hawkes (1990) las primeras papas domesticadas pertenecieron a la especie diploide *Solanum stenotomum*, la cual se derivó de *Solanum leptophyes* o probablemente de *Solanum canasense*. A su vez, *S. stenotomum* probablemente se cruzó con *Solanum sparsipilum*, una especie silvestre diploide, seguida de una duplicación cromosómica que dio origen a la especie cultivada tetraploide *Solanum tuberosum* subsp. *andigena*, aunque algunos trabajos indican que esta especie tetraploide se originó directamente de *S.*

stenotomum por simple duplicación cromosómica. Esta subespecie al ser llevada al sur de Chile por los antiguos habitantes de los andes se adaptó a los días largos y evolucionó a *Solanum tuberosum* subsp. *tuberosum*. Posiblemente la subsp. *andigena*, como progenitor masculino, se cruzó con otra especie silvestre diploide (posiblemente *Solanum chacoense*), poseedora de factores para la esterilidad citoplásmica, y dio origen a la subsp. *tuberosum* (Estrada, 2000).

Las otras especies cultivadas diploide son *Solanum goniocalyx* que es un derivado de *S. stenotomum* y apareció como una variante extrema. *Solanum phureja* descrita como una especie cultivada derivada por selección y mutaciones de *S. stenotomum*. Por último, *Solanum ajanhuiri* es un híbrido natural derivado del cruce entre *S. stenotomum* y *Solanum megistracolobum* un diploide resistente a heladas (Hawkes, 1982,1990).

Además existen 2 especies triploides cultivadas *Solanum chaucha* y *Solanum juzepczukii*. Se ha sugerido que *S. chaucha* es un híbrido triploide que resultó de cruces naturales de *S. tuberosum* subsp. *andigena* con *S. stenotomum*. Y *S. juzepczukii* es un híbrido derivado del cruce entre *S. stenotomum* y *Solanum acaule*, una especie silvestre tetraploide con alta resistencia a las heladas (Hawkes, 1962).

Solanum curtilobum es una especie cultivada pentaploide que apareció como híbrido natural pentaploide el cual fue formado a través de la unión de un óvulo no reducido de *S. juzepczukii* con polen no reducido de *S. tuberosum* subsp. *andigena*. (Hawkes, 1962; Schmiediche y col 1982) (Ver Figura N° 1).

3.1.3 Diversidad de especies de papa cultivada

3.1.3.1 Especies Diploides (2n = 24)

- ***Solanum stenotomum* Juz. et Buk.**, Esta especie se distingue, de manera fácil e inconfundible por la forma típica del tubérculo, que aunque varía de redondo a cilíndrico, delgado a grueso, posee en todos los casos enunciados, gran número de yemas, profundas, estrechas, con tuberosidades muy pronunciadas, dando el aspecto, según Hawkes de “concertina”. El color de los tubérculos es variado, según la variedades pueden ser blanco, amarillo, rosado, etc. Es susceptible a virosis, mas común que en las otras especies; al igual que al hongo *Alternaria solani* y a la larva de *Premnotrypes solani* (Vargas, 1949; Hawkes,1990).

- ***Solanum goniocalyx* Juz. et Buk.** Comúnmente llamada “papa amarilla” o “ckello papa” en la zona central del Perú; tiene una distribución geográfica amplia tan vasta como *S. tuberosum* subsp. *andigena*.

Los caracteres de forma, color del tubérculo, así como el color de la carne, de un amarillo típico, hacen a esta especie, bastante diferente de las demás. Añadiendo a esto los caracteres de otros órganos vegetativos y de los reproductores; siendo el color de la corola blanco crema pálida (Vargas, 1949; Hawkes, 1990).

- ***Solanum phureja* Juz. et Buk.,** Poseen considerable resistencia a varios importantes “stresses” bióticos tales como tizón ardío (*Phytophthora infestans*), marchites bacteriana (*Ralstonia solanacearum*), nematodos (*Meloidogyne incognita*) y virus (Virus X e Y de la papa), así como “stresses” abióticos. Presenta hojas insertas al tallo en ángulo agudo, folíolos estrechos y producen tubérculos con buenas propiedades culinarias (Vargas, 1949; Hawkes, 1990).
- ***Solanum ajanhuiri* Juz. et Buk.** Las primeras colectas taxonómicas la realizó S. Juzepczuk en el altiplano por encima de la ciudad de La Paz. (3800-4100 m.s.n.m.). También conocida como "Ajawiri" en Aymara. Poseen plantas arrosietadas y hojas poco pilosas. Presentan resistencia a heladas (Hawkes, 1990).

3.1.3.2 Especies Triploides (2n = 36)

- ***Solanum chaucha* Juz. et Buk.,** Son considerados precoces, producen entre 90 a 100 días. Se les designa por esto, en general, “chaucha” para denotar su precocidad, aun cuando también dicho termino es usado a menudo para cualquier otro clon que posea dicha característica, como en el caso de algunos clones de *S. tuberosum* subsp. *andigena*. De tubérculos largos fusiformes, con muchas yemas pequeñas, estrechas, superficiales, brotes blancos con pigmentación rosada o púrpura (Vargas, 1949; Hawkes, 1990).

- ***Solanum juzepczukii* Buk.,** Especie que se distingue fácilmente por su hábito de crecimiento en roseta; flores azules pequeñas; en general desarrollo muy limitado. Semejante a la especie silvestre *S. acaule* Bitt., en su hábitat porque crece a grandes alturas y es resistente al frío. Su distribución geográfica está limitada al Sur-Perú y a Bolivia.

La forma del tubérculo varía según las variedades que van desde curvas, ovaladas, cónicas, largo o chatos, de igual forma el color, amarillento, azul claro u oscuro. Es susceptible a *Phytophthora infestans* y *Alternaria solani* (Vargas, 1949; Hawkes, 1990).

3.1.3.3 Especies Tetraploides (2n = 48)

- ***Solanum tuberosum* subsp. *andigena* Hawkes.,** Es la especie que posee mayor número de variedades, entre todas las papas cultivadas andinas. Tiene amplio margen de variación adaptativa, gran desarrollo vegetativo, de los órganos reproductores, los tubérculos, etc. En cuanto a su adaptación, crece desde los valles mesotérmicos y sus laderas, hasta los altiplanos de la Puna.

Es de período vegetativo largo de 5 a 7 meses, floración abundante, polen muy fértil y abundante producción de bayas. Los tubérculos son de formas muy variadas, numerosos y de tamaño mediano y pequeño, con ojos ligeramente profundos y de alto porcentaje de almidón (Vargas, 1949; Hawkes, 1990; Estrada, 2000).

- ***Solanum tuberosum* subsp. *tuberosum*.** Es de período vegetativo corto de 3 a 4 meses, floración escasa y por corto tiempo, polen estéril en muchas variedades, escasa o nula producción de bayas. Los tubérculos son regulares y de buena forma, con ojos superficiales, de gran tamaño y escasos. Se distribuye principalmente en la región sur de Chile (Hawkes, 1990).

3.1.3.4 Especie Pentaploide (2n = 60)

- ***Solanum curtilobum* Juz. et Buk.,** Única especie cultivada pentaploide, de hábito de crecimiento mediano o enano, hasta de 35 cm. de altura, robusta,

foliosa; comúnmente cultivada en las penillanuras y altiplanos comprendidas entre los 850 - 3600 m.s.n.m. Se distingue por poseer 4-5 foliolos primarios los cuales son anchos, ovalados, de muy pocas entrehojuelas, haz menos piloso que el envés. Tubérculo oval, oval-redondo, chato; variable en el color, blanco, pigmentado de morado, azul claro y morado (Vargas, 1949; Hawkes, 1990).

(Ver Figura N° 2 y Figura N° 3)

3.1.4 Clasificación taxonómica de *Solanum* spp.

Las especies cultivadas de la papa están clasificadas dentro de la siguiente posición taxonómica según el Sistema de Engler (Engler, 1887–1915):

Reino	: Vegetal
División	: Fanerógamas
Subdivisión	: Angiospermas
Clase	: Dicotiledóneas
Subclase	: Simpétala
Sección	: Anisocárpeas
Orden	: Tubifloríneas
Familia	: Solanaceae
Genero	: <i>Solanum</i>
Sección	: Petota
Especies	: <i>Solanum</i> spp

(Información tomada de Ochoa, 1999).

3.2 Diversidad genética y variabilidad genética

La diversidad genética se define como: "la variedad de diferentes genes en una población reproductiva, dentro de una especie o dentro de todas las especies encontradas en un área dada". El término diversidad genética se usa para abarcar la diversidad dentro de una especie, mientras que diversidad específica es la expresión para la diversidad entre las especies, según propone Robert y Christine Prescott-Allen (FAO/PNUMA, 1991).

La diversidad genética existe en tres niveles: (a) diversidad dentro de las poblaciones reproductivas, (b) diversidad entre poblaciones reproductivas; y (c) diversidad entre las especies. (FAO/PNUMA, 1991).

No hay que confundir la diversidad genética con la variabilidad genética que esta constituida por las diferentes características dentro de una especie. Las especies pueden ser más o menos variables. La variabilidad genética se aplica a las características, puede ser cuantificada en términos de variancia genética aditiva y no aditiva (Sevilla, 2004)

Para conocer la diversidad genética es importante conocer que causa tal diferenciación, y como este proceso influye en la estructura de la diversidad genética, por ello es necesario desarrollar estrategias para mejorar la búsqueda de accesiones del germoplasma deseadas o características deseadas y que puedan ser llevadas eficientemente a grandes grupos de accesiones o en gran número de poblaciones conservadas *in situ* (Brown, 1989).

La diversidad genética dentro de una especie no está distribuida uniformemente a través del rango de ámbitos en los que ocurre. Evidencias actuales sugieren que la distribución geográfica puede tener mucho que ver en la variación observada en plantas silvestres (Hamrick y Godt, 1990). En los cultivos, los patrones de distribución geográfica también reflejan el efecto de la selección humana en ambientes particulares así como la historia del desarrollo del cultivo en diferentes localizaciones (Hodgkin, 1995).

Según Marshall y Brown (1975) las estrategias de conservación no solo podrían tomar la distribución absoluta de un alelo particular o grupo de alelos sino también sus frecuencias. Sugieren que existen 4 clases de alelos que podrían ser reconocidos: a) Comunes, ampliamente distribuidos, b) Comunes, localmente distribuidos, c) Raros, ampliamente distribuidos y d) Raros, localmente distribuidos.

Colectar la primera clase de alelos no es problema ya que tales alelos parecen estar incluidos en pequeñas muestras colectadas de pocas poblaciones. La conservación de

alelos raros ampliamente distribuidos dependerá de los recursos totales destinados a la conservación y será relativamente insensitivo a la estrategia elegida. La inclusión de alelos raros localmente distribuidos será muy dependiente del efecto estocástico y tales alelos serán incluidos solo si el tamaño de la muestra es muy grande. Sin embargo, la conservación de los alelos comunes en localizaciones específicas no están ampliamente distribuidas dependerán de la estrategia de muestreo en particular elegida y de los métodos para localizar tales variaciones. También consideran que esta clase de alelos es particularmente de interés porque incluirían alelos de significancia adaptativa para las poblaciones que los poseen. Además disponen de algunas medidas de diversidad. Se pueden identificar dos conceptos: riqueza alélica (el número de alelos distintos en una muestra) y la distribución alélica (distribución de frecuencias alélicas) (Brown y Weir, 1983).

3.3 Erosión Genética

Se denomina Erosión genética a la pérdida gradual de la diversidad genética. Aunque generalmente es aceptado que una cantidad significativa de erosión genética ocurre y sigue ocurriendo con la destrucción de ecosistemas y hábitats por las actividades humanas, existe muy poca información sobre las cantidades precisas y extensión de la pérdida (Sevilla, 2004). Ciertamente, debido a las comodidades alimenticias actuales ha habido un dramático incremento del uso de un pequeño número de cultivos uniformes altamente seleccionados y esto ha sido asociado a la reducción del número de cultivares nativos (en especial en países en desarrollo) y a la reducción de áreas en donde cultivos tradicionales y nativos crecían. La extensión de la pérdida de diversidad alélica de cultivos particulares no ha sido establecida (Hodgkin, 1995).

3.4. Conservación *In Situ*

3.4.1 Generalidades

Son muchas las estrategias de conservación que se han ido desarrollando en el transcurso del tiempo, desde las primeras colectas y reconocimiento taxonómico de diversos cultivos nativos por los años 20, y la creación de Bancos de Germoplasma

(conservación *Ex Situ*) de los diversos tubérculos andinos y de otros cultivos de importancia, a mediados de siglo XX. A inicios de la década de los 80, surge el interés en la conservación *In Situ*. Este cambio de dirección se reconoció en la Convención sobre la Diversidad Biológica, en la cual se enfatiza la complementariedad de las técnicas *Ex situ* e *In situ* (Tapia, 1998).

De acuerdo a la Convención de la Diversidad Biológica, se entiende por conservación *In situ* a la conservación de ecosistemas y sus habitats naturales, así como el mantenimiento y recuperación de poblaciones de especies en sus medios naturales. En el caso de especies cultivadas o domesticadas, la conservación *in situ* se realiza en los habitats donde esas especies cultivadas han desarrollado sus propiedades distintivas (Sevilla, 2004; Hodgkin, 1995).

La conservación *in situ* se hace necesaria principalmente debido a la gran diversidad de especies que poseen algunos países y la dificultad de conservarlos de manera *ex situ*. Además, para muchas especies nativas no se conoce ni la forma de reproducción ni la estructura genética de las poblaciones lo que hace difícil planear estrategias de conservación.

Los bancos de germoplasma de países en desarrollo tienen muchos problemas de mantenimiento. Los costos de conservación son altos y los procedimientos utilizados reducen, en muchos casos, la variabilidad de la muestra. Además, los bancos representan solo una fracción de la diversidad de la especie (Sevilla, 2004; Hodgkin, 1995).

Algunas experiencias globales preliminares de la conservación *in situ* han logrado obtener algunos alcances valiosos. Se ha visto que por lo general la mayor diversidad se encuentra en las chacras de los pequeños agricultores, además muchos de ellos siguen produciendo sus variedades tradicionales a pesar de la importancia que se le ha dado a la semilla mejorada. Los problemas ecológicos y ambientales como la degradación de suelos y largas sequías son una gran amenaza y la falta de una legislación adecuada dificulta la práctica sostenible de la conservación. También se evidencia el importante rol de la familia y en especial de la mujer en la conservación (Sevilla, 2004).

3.4.2 Proyecto de “Conservación *In situ* de los cultivos nativos y sus parientes silvestres”

En el Perú hay una gran diversidad cultural que esta ligada a la conservación de la biodiversidad. El proyecto denominado “Conservación *In situ* de los cultivos nativos y sus

parientes silvestres”, esta orientado a reforzar la conservación en chacras de los cultivos nativos, contando con la participación de las comunidades campesinas del país.

Al cierre del proyecto, en el año 2005, los avances y logros mas notables conseguidos son: la identificación de ocho microgenocentros, la identificación de 26 amenazas distintas, el registro de mas de 750 agricultores conservacionistas, inventarios de chacras, ubicación y medidas de las mismas, el desarrollo de una metodología estándar para inventariar la diversidad de cultivos en chacras campesinas (descriptores convencionales y campesinos), el registro y conservación de variedades nativas, la identificación participativa de algunos parientes silvestres, el registro etnobotánico, la organización e inventario de ferias campesinas, la identificación de rutas de semillas de los cultivos priorizados, el registro de practicas agronómicas conservacionistas, el registro de mas de 113 tecnologías tradicionales, inventarios de productos, registros, platos típicos y saberes ancestrales campesinos (Sevilla, 2004; INIEA, 2005 a-e).

3.4.3 Inventarios y caracterización de la diversidad

Los inventarios y caracterización de las variedades nominales de los cultivos priorizados, dentro de ellos la papa, fue utilizado dentro del proyecto de Conservación *In situ* para estimar el grado de diversidad y variabilidad que presentan dentro de las chacras de los campesinos conservacionistas.

Al cierre del proyecto, al menos el 75% de las áreas de cultivo seleccionadas en los sitios objetivos de trabajo se mantienen con respecto a la línea de base de la campaña 2001-2002 o se ha incrementado en un 10% en 141 comunidades andino-amazónicas del Perú.

En las comunidades de Cuzco, con respecto a las variedades de papa hubo un incremento de variabilidad del 10% (INIEA, 2005 a) mientras que en las comunidades de Ayacucho que participaron en el proyecto hubo un incremento del 250% en relación al 2001 (INIEA, 2005 b). El resultado del análisis a nivel del distrito de Pomata en Puno, en la comunidad Lampa Grande hubo un incrementó en el registro de 140 a 497 variedades nominales y en la comunidad de Huacani que comenzó su registro en la segunda campaña agrícola, incrementó en el registro de 215 a 395 variedades nominales (INIEA, 2005 c). En las comunidades de Lirio en Cajamarca, el registro se incremento de 35 a 205 variedades nominales de papa en la campaña 2004-2005, siendo la especie *S. tuberosum* subsp. *andígena*, la que presento un mayor número variedades (INIEA, 2005d). Por ultimo, las

comunidades de Yauli en Huancavelica con respecto a la papa nativa han mantenido el 53% en relación a la línea base de la campaña 2001-2002. Por otro lado, el incremento de las papas nativas ha sido de 137%, siendo *S. tuberosum* subsp. *andígena* la que presentó un mayor incremento (INIEA, 2005 e).

3.4.4 Dinámica de la diversidad en la Conservación *In situ*

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 (INIEA, 2005 a-e).

La distribución de la variabilidad, tomando como ejemplo las papas nativas, el acompañamiento a los conservacionistas y los registros de inventarios, permite manifestar que existe un grado de distribución de la variabilidad que sin ser equitativa es un soporte y garantía para la conservación, puesto que aquellos agricultores que conservan pocas variedades nativas, existen algunas variedades que no las poseen aquellos agricultores que conservan muchas variedades (INIEA, 2005 a-e).

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.

3.5 Marcadores Moleculares en el estudio de la diversidad genética

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 genética (Ayad y col, 1997).

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, estudios de filogenia y evolución, para trazar rutas de domesticación, para estudiar las relaciones entre diversidad y ambiente y para estudiar el “pool génico” completo de un cultivo o la diversidad en una parte específica de un pool génico.

Las categorías de marcadores difieren en algunos atributos: nivel de polimorfismo, grado de estabilidad ambiental, número de loci, bases moleculares del polimorfismo, practicidad y costos, por lo que se elegirá el adecuado dependiendo del objetivo de estudio y presupuestos (Karp y Edwards, 1995).

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 *S. phureja* y la construcción de una Colección núcleo. (Ghislain, 1999). Los marcadores moleculares RAPD, son secuencias de ADN amplificada por un iniciador arbitrario y aunque son de bajo costo y no necesita conocimientos especiales del genoma a analizar tiene 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 investigación (Ferreira y Grattapaglia, 1998).

En el año 2000, Huamán realizó el análisis de la estructura génica de las colecciones núcleos de *S. tuberosum* subsp. *andigena* mantenidas en el CIP, mediante el uso de isoenzimas, validando las estrategias de colección de esta especie. Las isoenzimas también conocidas como marcadores bioquímicos, aunque en la actualidad siguen siendo usados, tienen la desventaja de ser específicos de un tejido, de un estadio de desarrollo en particular o de su función metabólica lo que les quita la característica de neutralidad. (Ferreira y Grattapaglia, 1998).

Estos primeros trabajos estaban guiados a la identificación de duplicados y a validar las estrategias de colección de los bancos de germoplasma. Aunque los resultados obtenidos fueron favorables, era necesario corroborar los resultados por técnicas moleculares más robustas, confiables y que pudieran brindar mejor información de la diversidad genética mantenida.

3.6 Microsatélites o Secuencias Simples Repetidas – SSR

3.6.1 Bases genéticas y estudios realizados

El uso de marcadores microsatélites, siendo una técnica muy costosa en las primeras etapas de su desarrollo, en comparación con los marcadores ya mencionados tiene mayores ventajas, lo que ha hecho que en los últimos años se implemente estudios de diversidad genética basados en estos marcadores (Powell et. al., 1996a; Ames 2003 y Andrade, 2001).

Las secuencias simples repetitivas-SSR o microsatélites son secuencias de ADN consistentes de unidades repetitivas en tandem de mono-,di-,tri-, tetra-, o penta-nucleótidos, que se encuentran repartidos a través del genoma de muchas de las especies eucarióticas (Powell, 1996a).

El polimorfismo de los microsatélites es revelado por el uso de amplificaciones de PCR (Polymerase chain reaction) (Saiki y col, 1988) con ayuda de dos iniciadores únicos, compuestos de regiones cortas de aproximadamente 20 nucleótidos específicas y complementarias a las regiones flanqueantes de la región microsatélite. Estos productos amplificados pueden ser detectados mediante geles de poliacrilamida de alta resolución con tinción en plata, radiactividad o fluorescencia.

La alta tasa polimórfica característica de los microsatélites, inclusive en organismo con baja variabilidad genética (Zwettler et al. , 2002), es debida a que en estas regiones repetitivas existen altas tasas de eventos mutacionales debido principalmente a “slipped-strand mispairing” (hibridación errónea por deslizamiento de la hebra) lo que vienen a ser errores de la ADN polimerasa durante el proceso de replicación del ADN (Schlotterer and Tautz, 1992) Estos errores se deben a que una de las cadenas ya sea la nueva o la antigua se desliza o corre sobre la otra en al menos un motivo, resultando en un mal apareamiento de las mismas y de ese modo ocurre un cambio en el número de repeticiones (Moxon y Wills, 1999).

El crecimiento de estas regiones resulta de la ganancia de unidades repetidas a través del tiempo, ya sea debido a eventos mutacionales mas frecuentes o a eventos de reparación menos frecuentes. Debido a que las mutaciones agregan o sustraen lentamente unidades repetitivas a un arreglo de microsatélites en particular, una serie de alelos de diferente tamaño (número de repeticiones) aparecen en la población (Jin y col, 1996; Pete y col, 1997; Estoup y Cournet, 1999). El número de alelos es controlado por procesos

genéticos–poblacionales clásicos tales como procesos de mutación, selección, flujo génico y migración (Di Rienzo y col, 1994; Feldman y col, 1997; Kriglyax y col, 1998).

Por último, los procesos que hacen que una región microsatélite desaparezca puede deberse a que los arreglos largos son particularmente propensos a deleciones grandes o sustituciones nucleotídicas simples. Aquí el evento podría regenerar alelos pequeños y crear arreglos interrumpidos, los cuales pueden reducir la base en la cual se genera el polimorfismo sirviendo como puntos de anclaje contra los resbalones de la polimerasa durante la replicación (Hancock, 1999).

Para el caso de la papa, los microsatélites vienen siendo usados aproximadamente hace 10 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 comparan 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 1998 Milbourne logra determinar la localización de 112 iniciadores microsatélites en un mapa genético de papa previamente elaborado con RFLP.

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 silvestres. Son este grupo de iniciadores los que fueron utilizados en el presente trabajo (Ver anexos 11.2) sin tener dificultades mayores en estandarizar protocolos y obteniendo patrones de bandas similares a los obtenidos en el CIP

3.6.2 Ventajas y desventajas de los microsatélites

Debido a que los microsatélites son locus frecuentemente hipervariables, es decir, poseen algunos alelos en frecuencias relativamente altas, ellos son ideales para la identificación molecular de individuos. El patrón de relaciones entre individuos puede también ser determinado mediante el uso de estos marcadores. Son consideradas herramientas casi perfectas debido a su naturaleza altamente discriminativa y codominante (los estados homocigotes y heterocigotes pueden ser distinguidos), lo cual los hace más informativos que otros marcadores. (Powell y col, 1996b; Ferreira y Grattapaglia, 1998).

La mayor ventaja del análisis de microsatélites es el gran número de bandas polimórficas que el método revela. Los valores de heterocigocidad encontrados para los microsatélites son mucho más elevados en comparación con las alozimas (otro marcador de loci simple) y los RFLP, que por lo general es común encontrar solo entre 2 a 4 alelos mientras que con microsatélites pueden revelar entre 2 a 25 alelos, demostrando así su alto grado de polimorfismo (Powell y col, 1996b).

Los microsatélites al ser marcadores codominantes permiten la rápida identificación de heterocigotes. La codominancia de los microsatélites incrementa la agudeza y eficiencia de medidas genético-poblacionales basadas en estos marcadores en comparación con otros marcadores tales como AFLP y RAPD (marcadores dominantes), además, la identidad de heterocigotes en la generación F1 hace de los análisis de flujo génico, hibridación y paternidad más simples (Shlotterer y Pemberton, 1994).

El hecho que el método se base en el ADN le otorga ventajas adicionales tales como su capacidad para trabajar con material antiguo u hojas secas en el caso de plantas. En comparación con las alozimas, los microsatélites parecen ser selectivamente neutrales lo que no es esencial para estudios filogenéticos pero es una de las asunciones necesarias al usar marcadores en muchos análisis (Robinson y Harris, 1999).

Por otro lado, una de las mayores desventajas del uso de microsatélites es la necesidad de búsqueda de estos locus en el organismo a estudiar. Hay varias vías para la búsqueda de los microsatélites; sin embargo todas son complejas y de elevado costo como por ejemplo el desarrollo de bibliotecas genómicas. En el caso de la papa, debido a la existencia de un “kit” de iniciadores no se ha visto esta desventaja. Así mismo, es necesario usar en la mayoría de los casos, técnicas de separación de fragmentos de alta resolución (geles de secuenciación),

Otra de las desventajas vienen a ser los resbalones (“slippage”) de la Taq polimerasa durante el proceso de amplificación, derivando en productos generalmente menos intensos que los productos deseados.

El problema más serio de los microsatélites representa en la homología, ya que es necesario asumir que los fragmentos comigrantes son homólogos, lo cual no necesariamente puede ser real, ya que mutaciones puntuales pueden ocurrir sin afectar el peso del fragmento, esto constituye un problema principalmente cuando se quiere realizar estudios filogenéticos (Robinson and Harris, 1999).

IV. MATERIALES Y METODOS

4.1 Materiales

4.1.1 Material Biológico

- **Colección al azar:** Se colectaron al azar 79 variedades nominales de papa nativa (*Solanum* spp.) perteneciente a los agricultores participantes del Proyecto de Conservación *In situ* de los cultivos nativos y sus parientes silvestre: 25 variedades de Ayacucho (8 de Luricocha y 17 de Vinchos), 14 variedades de Cuzco (Ocongate), 15 variedades de Puno (Pomata), 13 variedades de Cajamarca (Huasmín) y 12 variedades de Huancavelica (Antacocha) (Ver Anexo 11.1).

Ácidos Nucleicos:

- ADN del fago Lambda (Gibco)
- ADN del plásmido pUC 18 obtenido en el laboratorio de biología molecular del CIP

4.1.2 Enzimas y Kits

- Kit de Amplificación Taq polimerasa (Invitrogen)
- Kit de secuenciamiento (Promega)
- RNAasa(SIGMA)
- dNTPs mix 10mM (Invitrogen)
- Enzima de restricción Msp I (Promega)
- Enzima de restricción Pst I (Gibco)

4.1.3 Reactivos

- Acido Acético (Merck)
- Ácido Bórico (Sigma)
- Alcohol isoamílico (Merck)
- Acrilamida (Sigma)
- Agarosa (Sigma)
- Azul de Bromofenol
- Bisacrilamida (Sigma)
- Bromuro de Etidio (Sigma)
- Bromuro de Hexadeciltrimetil amonio (CTAB) (Aldrich)
- Carbonate de Sodio (Merck)
- Cloroformo (Merck)
- Cloruro de Potasio (KCl) (Sigma)
- Cloruro de Sodio (NaCl) (Merck)
- Dimetil diclorosilano (repelente)
- EDTA (acido etilen diamino tetra acético) (Sigma)
- Etanol absoluto (Merck)
- Formaldehído 37%(Merck)
- Formamida (Sigma)
- Hidróxido de sodio (Merck)
- Isopropanol (Merck)
- Mercaptoetanol (Sigma)
- Naranja G (Sigma)
- Nitrato de Plata
- Nitrógeno líquido
- Persulfato de Amonio (Sigma)

- Persulfato de amonio (Sigma)
- Sacarosa (Sigma)
- Silano de adhesión (p-metacriloxipropil trimetoxi silano) (Sigma)
- TEMED (N.N.N'.N'-Tetra-metil etilen di-amina)(Applichem)
- Tiosulfato de Sodio
- Tris (Tris [hidroxi metil] amino etano) (Sigma)
- Urea (Applichem)
- Xileno Cianol(Sigma)

4.1.4 Equipos

- Baño María (Precision Scientific, modelo 188)
- Cámara de Electroforesis Horizontal (Gibco)
- Cámaras de Electroforesis Vertical (Gibco, Modelo S2)
- Captador de imágenes digital (Clear One)
- Fuentes de Poder de 200 y 3600 voltios (EC 250-90 Termo electrocorporation)
- Juego de pipetores de 0.5-10, 2-20, 10-100, 50-200 y 100-1000 ml (Eppendorf)
- Microcentrífuga (Eppendorff)
- Orbital Shaker (VWR DS2 – 500 E2)
- Sistema de Agua Ultrapura (Barnstead – Easy pure)
- Termocicladores (MJ. Research, modelo PTC 100 y PTC 200)
- Transiluminador UV (Bio Rad)

4.1.5 Materiales de vidrio y otros

- Cinta adhesiva (Masking tape)
- Espátulas, pinzas y tijeras
- Gradillas para tubos de microcentrífuga
- Guantes de vinil (Safe Skin)
- Matraces y vasos de precipitado
- Papel Watman N° 1
- Placas de policarbonato para PCR de 96 muestras con tapas (Axigen)
- Placas de vidrio para electroforesis vertical
- Probetas de 100, 250, 500 y 1000 ml
- Puntas plásticas cortadas 200 ml (Daigger, Oxford y Fisher)
- Puntas plásticas sin cortar de 50, 200 y 1000 ml (Daigger, Oxford y Fisher)
- Tubos para microcentrífuga de 0.6 ml
- Tubos para microcentrífuga de 1,5 ml

4.2 Métodos

4.2.1 Extracción de ADN

El ADN fue aislado mediante el Método CTAB modificado de Doyle y Doyle (1990).

Se utilizaron hojas jóvenes y frescas de tubérculos sembrados en invernadero de una edad aproximada de 1 mes, enviados de las zonas estudiadas. Se pesaron 100 mg de tejido (aproximadamente 2 a 3 hojas medianas) y se molieron en morteros preenfriados con nitrógeno líquido. El polvo obtenido fue transferido a 2 tubos de microcentrífuga de 1.5 ml, a cada tubo se le adicionó 700 μ l de CTAB 2X y 2 μ l de Mercaptoetanol, luego se agitó suavemente e incubó a 65 °C por 45 minutos con agitaciones cada 15 minutos y se dejó la muestra a temperatura ambiente por 2 minutos.

A cada tubo se agregó 700 μ l de CIA (cloroformo alcohol isoamílico 24:1) agitandolos suavemente. Se centrifugaron por 5 minutos a 14000rpm. La fase acuosa fue separada en nuevos tubos, cuidando de no absorber la interfase, el resto del material fue descartado (interfase y precipitado)

Se agregaron 50 μ l de CTAB 10X (en 0.7M de NaCl), agitándose suavemente hasta obtener una mezcla uniforme.

Se repitieron los pasos con el CAI, la centrifugación por 5 minutos a 14000rpm y la separación de la fase acuosa.

Se agregó un volumen igual de isopropanol (-20 °C) a cada tubo y luego fueron invertidos varias veces y dejados enfriar a -20 °C por 30 minutos. Se centrifugaron a 14000 rpm por 20 minutos y se elimino el sobrenadante sin perder el precipitado de ADN.

El precipitado fue lavado por 3 minutos con 1 ml de etanol al 70%, se centrifugaron a 14000rpm durante 30 minutos y se eliminó con cuidado el etanol. El precipitado es sometido a un segundo lavado con etanol al 95%, nuevamente centrifugado a 14000 por 30 minutos y el sobrenadante fue eliminado.

Cada muestra de ADN fue diluida en 100 μ l de TE, se agrego 2 μ l de RNAsa y se dejo incubando a 37 °C durante 2 horas. Luego de este proceso el ADN puede ser almacenado indefinidamente a - 20 °C y a - 4 °C para uso próximo.

Para ver la composición de los reactivos utilizados ver el anexo 11.3

4.2.2 Evaluación de la calidad y cantidad de ADN

La calidad y concentración del ADN extraído se llevo a cabo mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% utilizando como patrón de referencia al fago lambda cortado con la enzima Pst I.

Se pesaron 1 gr. de agarosa y se diluyó en TBE 1X calentándolo por 3 a 5 minutos en un horno microondas. Luego de enfriar la solución alrededor de 40 ° C se le agrego 2 µl de Bromuro de etidio (10mg/ml) y se vertió en un molde.

Se tomó 1 µl de cada muestras de ADN y se lo mezcló con 8ul de agua miliQ y 1ul de tampón de carga para geles de agarosa SALB 10X (Ver Anexo 11.4), luego el gel fue colocado en una cámara de electroforesis horizontal conteniendo tampón TBE 1X con 2 µl de bromuro de etidio y se corrió a 100 voltios durante 1 hora aproximadamente.

Junto con las muestras, se cargaron 10 µl de marcador de peso molecular: Fago Lambda cortado con PstI que es equivalente a 1 µg de ADN digerido.

La cantidad aproximada de ADN se estimó comparando la intensidad y grosor de cada una de las bandas con la primera banda del marcador lambda, la cual es equivalente a 280 ng. (Ver Figura N° 4)

4.2.3 Dilución del ADN para amplificación

Como condición de amplificación las muestras de ADN deben estar a una concentración de 10ng/µl. Una vez determinada la cantidad total aproximada de ADN se procedió a diluir las muestras con T₁₀E₁ a un volumen de 200 µl usando tubos de microcentrífuga de 0.6 ml para cada muestra.

4.2.4 Amplificación de regiones microsatélites por PCR

La amplificación se llevó acabo según los protocolos del CIP (CIP, 1997) adaptados de Provan y col (1996) (Ver Tabla 1). Primero se agregó 2µl de cada muestra a una placa de policarbonato para PCR y luego se procedió a preparar la mezcla de amplificación (master mix) para un volumen de 20 µl, todo sobre hielo.

Tabla 1: Protocolo de amplificación para una muestra (CIP, 1997; Provan, 1996)

Stock	[] Inicial	[] Final
H ₂ O libre de nucleasas		c.s.p. 20 µl
Buffer de Reacción	10X	1X
MgCl ₂	50 mM	2.5 mM
DNTP	5 mM	0.2 mM
Iniciador F	10 uM	0.5 uM
Iniciador R	10 uM	0.5 uM
Taq polimerasa	5/ul U	0.5 U
Muestra ADN	10 ng/µl	20 ng

El volumen de **Taq polimerasa** usado se ajusta según especificaciones del fabricante.

Las condiciones de amplificación se desarrollaron en dos termocicladores MJ Research Inc. modelos PTC100 y PTC 200 (Ver Tabla 2). Para dos pares de iniciadores (STM037 y STM1052), fue necesario utilizar programas alternativos de amplificación estandarizados por la Blga. Zorrilla del CIP (Comunicación personal, 2005) para reducir las amplificaciones inespecíficas (Ver Tabla 3 y 4).

La Temperatura de alineamiento (T° ann) esta determinado para cada iniciador, y va desde los 47 °C hasta 57 °C (Ghislain, 2001) (Ver anexo 11.2)

Tabla 2: Programa de amplificación para las secuencias microsátélites

Ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo (min.)
1 ciclo	94 °C	3.0
	T° ann	2.0
	72 °C	1.5
30 ciclos	94 °C	1.0
	T° ann	2.0
	72 °C	1.5
1 ciclo	72 °C	5.0
	4 °C	∞

Tabla 3: Programa alternativo de amplificación para el iniciador STM1052

Ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo (min.)
1 ciclo	94 ° C	4.0
1 ciclo	94 ° C	1.0
1 ciclo	60 °C	1.0
1 ciclo	50 ° C	0.5 ° C/seg.
1 ciclo	72 ° C	1.0
25 ciclos	94 ° C	1.0
	50 °C	1.0
	72 ° C	1.0
1 ciclo	72 ° C	5.0
	4 ° C	∞

Tabla 4: Programa alternativo de amplificación para el iniciador STM0037

Ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo (min.)
1 ciclo	94 ° C	2.0
10 ciclos	94 ° C	40 segundos
	60 °C	40 segundos - 0.5"/cyc
	72 ° C	1.0
	94 ° C	40 segundos
22 ciclos	55 °C	40 segundos
	72 ° C	1.0
1 ciclo	72 ° C	5.0
	4 ° C	∞

4.2.5 Iniciadores SSR utilizados

Se eligieron 18 pares de iniciadores microsátélites, mapeados para *Solanum tuberosum*, de manera que todos los cromosomas fueran analizados. Estos iniciadores forman parte del kit que utiliza el CIP para caracterizar molecularmente variedades de papa. (Ghislain, 2001) (Ver Anexo 11.2)

4.2.6 Electroforesis de productos amplificados - PAGE 6%

Los productos de amplificación fueron separados en geles denaturantes de policrilamida (acrilamida al 6%, bisacrilamida 0.3%, Urea 7M y TBE 1X) mediante electroforesis vertical en un sistema de secuenciamiento modelo S2 (Gibco) aplicándole un voltaje de 1600 V (40W). El tiempo de corrida fue dependiente del tamaño de los fragmentos amplificados, tomando como referencia el xilencianol, el cual tiene un peso equivalente de 110pb.

A cada muestra se le agregó 10 µl (50 % del volumen de reacción) de tampón de carga (formamida 96 % v/v, 10 mM EDTA pH 8.0, 0.05 % v/v de azul de bromofenol y 0.05% w/v de xilen cianol). Una vez que todas las muestras se han mezclado bien con el tampón de carga se procedió a denaturar las muestras a 95°C durante 5 minutos. Se cargaron al gel de poli(acrilamida) de 6 a 4 µl de muestras dependiendo de la eficiencia de amplificación del iniciador.

Para determinar el peso molecular de los fragmentos amplificados se utilizó como marcador de peso la reacción de secuenciamiento del plásmido pUC-18 que nos permitió determinar con exactitud el peso en pares de bases de las regiones amplificadas.

Los detalles de la preparación de los geles de acrilamida se encuentran en Anexo 11.5

4.2.7 Detección de los productos por Tinción con Nitrato de plata

La detección de los fragmentos amplificados se utilizó un protocolo de tinción con nitrato de plata, sugerido por Promega (Promega Corporation, 1996). El proceso de tinción consta de tres pasos básicos: fijación, tinción y revelado, que a continuación se describe con algunas modificaciones:

1. Preparación de soluciones:

- a. **Solución fijadora/detenedora** (ácido acético glacial 10%): Se adicionó 100 ml de ácido acético glacial en 900 ml de agua destilada.
- b. **Solución de tinción:** se disolvió 1 gr de nitrato de plata (AgNO_3) en 1000 ml de agua ultra pura y se agregó 1.5ml de formaldehído al 37%.
- c. **Solución reveladora:** se disolvió 22.5gr de carbonato de sodio (NaCO_3) en 750ml de agua ultra pura. Inmediatamente antes de usar, se adicionó 1.125ml de formaldehído al 37% y 16 μl de tiosulfato de sodio (100mg/ml)

2. **Fijación del gel:** Una vez finalizada la corrida electroforética, se separan las placas de vidrio con la ayuda de una espátula. La placa mas pequeña que contiene el gel es colocado en una bandeja con la solución fijadora y se dejó agitando durante 30 minutos. Luego de finalizado este proceso la solución es guardada para ser usada en la etapa final del revelado.

3. **Lavados:** Una vez concluido el tiempo de fijación, el gel contenido en la placa es sometido a dos enjuagues de agua ultra pura de 5 minutos cada uno.

4. **Impregnación con Plata:** El gel ya escurrido fue transferido a la solución de tinción y dejado en agitación por 30 minutos. Es recomendable que la bandeja donde se realiza la tinción se encuentre en oscuridad para que ayude a la reacción de impregnación.

5. Revelado del gel:

- a. Antes de usar la solución reveladora se agregó 1.125 ml de formaldehído al 37% y 16 μl de tiosulfato de sodio, esta solución tiene que estar a una temperatura aproximada de 10°C y debe ser vertida a una bandeja de fondo claro para poder contrastar el proceso de revelado
- b. Luego de haber finalizado el proceso de tinción, el gel es lavado en agua ultra pura por 5 a 10 segundos para retirar el excedente de plata. El tiempo de enjuagues es crítico debido a que tiempos prolongados disminuirán la intensidad de las bandas.
- c. Inmediatamente después el gel es sumergido y agitado en la solución reveladora hasta que el patrón de bandas sea visible. Debe tenerse en cuenta

que tiempos prolongados de revelado dan como consecuencia un fondo muy oscuro o amarillo.

- d. Cuando la intensidad de las bandas y el contraste son los deseados se procedió a detener el revelado y fijar la tinción utilizando la solución fijadora agitando el gel hasta que la producción de burbujas se detuviera.

4.2.8 Registro de patrones de bandas.

El patrón de bandas (alelos) obtenidos para cada iniciador fue registrado en una matriz binaria en donde las bandas presentes se les asignó el valor 1 y a las ausentes el valor 0.

La determinación del tamaño de los alelos se realizó comparando los tamaños en pares de bases de las bandas resultantes de la reacción de secuenciamiento del plásmido pUC-18 (Ver Anexos 11.6).

Por efecto de la condición denaturante del método, los fragmentos de ADN se separan en sus dos cadenas. Estas cadenas al tener diferente composición nucleica presentan diferencias de carga eléctrica en su estructura primaria, por lo que migran de diferente forma. Es por esto que para cualquier alelo observamos dos bandas: una superior y otra inferior. Siguiendo como referencia trabajos similares (Andrade, 2001; Ames, 2003), se tomó la banda superior como banda referencial para la determinación del tamaño del fragmento debido a su mayor intensidad y mejor definición (Ver Figura N° 5).

4.2.9 Análisis de Resultados

4.2.9.1 Análisis de agrupamiento

Por la característica codominante de los marcadores microsatélites el coeficiente de asociación DICE es uno de los más apropiado para este análisis, debido a que cuenta el porcentaje de bandas compartidas entre dos individuos y le da más importancia a aquellas bandas presentes en ambos. Considera que la ausencia tiene menor importancia biológica y, de esta manera, este coeficiente tiene un significado completo en función de la similitud del ADN. (Dice, 1945; Nei y Lei, 1979).

$$\text{DICE} = 2a / (2a + b + c)$$

Donde:

- a: número de veces que ambos individuos tengan presente el mismo carácter comparado (1-1).
- b: número de veces que el primero de ellos tenga el carácter presente y el segundo ausente (1-0).
- c: número de veces que el primero de ellos tenga el carácter ausente y el segundo presente (0-1)

El análisis de agrupamiento fue realizado mediante el método de UPGMA o método de agrupamiento de pares no ponderados usando la media aritmética. Este método minimiza la distancia entre grupos, al tomar la distancia promedio de todos los pares entre los individuos de la muestra (Rohlf, 1993). Mediante este análisis es posible dividir una población de individuos en un número determinado de subgrupos, optimizando el grado de homogeneidad interna de cada uno (Quevedo, 1993).

El cálculo del índice de similitud, análisis de agrupamiento y su grado de correlación fueron realizados con la ayuda del software NTSYSpc ver 2.0.

Para obtener un mayor consenso de los grupos formados por el análisis de agrupamiento y de similitud se realizó un análisis de bootstrap. Este es un método de remuestreo con reemplazo con la misma matriz de datos. Permite el cálculo de las desviaciones estándar y varianzas, y es útil para aquellas situaciones en las cuales el número de muestras o los recursos (por ejemplo, el tiempo, el presupuesto) son limitados. Este análisis fue realizado con ayuda del programa WinBoot, (Yap, 1986-1991).

4.2.9.2 Comparación de la riqueza alélica de cada locus en las cinco regiones de colecta.

Para determinar la cantidad de alelos que presentaban del total registrado, las variedades analizadas se agruparon según su procedencia. Además se analizó los alelos compartidos entre las cinco regiones de colecta. Para esto, una vez caracterizado los patrones alélicos se agruparon en alelos comunes y en alelos no comunes para cada locus

en las cinco regiones, determinándose el rango de alelos comunes y raros o privados retenidos en cada región.

4.2.9.3 Índice de contenido polimórfico (PIC), Índice de Diversidad genética y comparación por regiones

Si dos o mas alelos coexisten en la población entonces se dice que el locus es polimórfico. Si uno de los alelos tiene una frecuencia muy alta 99% o mas entonces ninguno de los otros alelos será observado en una muestra a menos que el tamaño de la muestra sea muy grande. Por ello un locus se define como polimórfico si la frecuencia de los alelos mas comunes es menos del 99% (Li, 1997).

Diversidad genética en un locus se define por:

$$h = 1 - \sum_{i=1}^m X_i^2$$

$$I = 1$$

X_i = frecuencia del alelo i

m = N° de alelos observados en el locus

h = probabilidad que 2 alelos tomados al azar de la población sean diferentes (Nei, 1973)

Debido a que la población total analizada es un grupo de diferentes especies con diferentes números de ploidía y por lo tanto con diferentes frecuencias alélicas, el índice de diversidad de Nei fue usado como índice de contenido polimórfico - PIC (Polymorphic Index Content), el cual nos indica un estimado de la eficiencia del polimorfismo de cada marcador para cada locus microsatélite analizado (Smith y col, 1997). El mismo concepto se uso para analizar el polimorfismo generado por los 18 marcadores microsatélites para cada una de las 5 regiones de colecta.

Solo se utilizo el concepto de Heterocigosidad esperada (h) para las variedades que pertenecían a la especie *Solanum tuberosum* subsp. *andigena* (42 variedades) y otro grupo para las que pertenecen a *S. chaucha* (18 variedades), por ser las que poseen mayor numero de variedades en la muestra analizada. El resto de variedades pertenecientes a las especies *S. stenotomum*, *S. goniocalyx*, *S. phureja*, *S. ajanhuiri* y *S. curtilobum* (19 variedades en total) no fueron consideradas para dicho análisis.

V. RESULTADOS

5.1 Registro y caracterización de los 18 iniciadores microsatélites

5.1.1 Número de alelos amplificados por locus

De los 18 iniciadores microsatélites analizados, 17 amplificaron un solo locus polimórfico mientras que el iniciador STM0019 amplificó 2 locus.

Los locus del STM0019 fueron separados según las diferencias de su peso molecular y fenotipo de las bandas: STM0019a para el loci de mayor tamaño (157-214pb) y STM0019b para el de menor tamaño (93-106 pb).

De las 79 variedades utilizadas, 16 no concuerdan con el número de alelos esperados para un marcador, siendo el iniciador STM2013 el que presenta con mayor frecuencia este fenómeno (7 variedades de *S. tuberosum* subsp. *andigena*, 5 de *S. chaucha* y 1 de *S. goniocalyx*). El iniciador STM0019b da un aumento para 2 variedades de *S. goniocalyx* y el iniciador STM2022 da un incremento para la única variedad de la especie *S. ajanhuiri* (Ver Tabla N° 6).

Se cree que el iniciador STM2013 también posee dos regiones microsatélites (Ghislain, 1999b; Andrade 2001) pero que no se ve diferencias en el peso (pb) ni en el fenotipo de las bandas. Por tal motivo, este marcador también podría ser considerado multilocus pero no se ha podido definir la diferencia de los locus.

El iniciador STM3023, según Ghislain (1999b) y Andradre(2001), presenta dos regiones polimórficas con diferencias en los fenotipos de las bandas aunque entre ellas existe una sobreposición de pesos. Para el presente trabajo no se llegó a determinar dichas diferencias, por lo tanto fue considerado como un loci único.

Los iniciadores STM0037 y STM1052 fueron amplificados con protocolos alternativos, modificados por la Blga. Zorrilla en el CIP (comunicación personal), debido a su baja resolución. En el caso del STM1052, aun con los protocolos modificados se vio que existían bandas difusas por encima del primer alelo registrado, lo que hizo muy difícil distinguirlos y por lo tanto, no fueron considerados en el registro de bandas.

El rango de alelos encontrados por locus, va desde 5 alelos para STM1049 y STM1053, hasta 16 alelos para STM0019a, siendo el promedio de alelos por locus de 8.79. No se encontró relación importante entre el motivo repetitivo y el tamaño de alelos encontrados (Ver Tabla N° 5).

Las 79 variedades amplificaron para los 18 iniciadores, por lo que se podría afirmar que no se encontraron genotipos con alelos nulos, aunque si consideramos aquellos marcadores que presentaron regiones multilocus sobrepuestas o no definidas (STM2013 y STM3023), podríamos considerar la existencia de este tipo de alelos.

Tabla 5: Caracterización y determinación del peso de los alelos registrados para los 19 locus analizados.

Marcador	N° ALELOS																
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	
1	STWAX2	243A	234G	230T	228A	226T	224C	218A									
2	STM3012	212T	198G	196T	168A	156T	153A	150C									
3	STM1104	180C	178A	177A	175G	174C	173C	172G	171A	168A	167T	166A	163A				
4	STM1031	298C	275G	273G	271T	269T	265A	262G									
5	STM0031	199G	194C	193G	187T	186G	185A	181A	160C	152C	148C						
6	STGBSS	142T	140G	139T	136A	135A	134G	133T	132G	130G	128C	125T					
7	STM1052	229A	228A	225A	221T	213G	212T										
8	STPcoA58	255C	250G	249C	242C	241T	237G	236T	234G	233C							
9	STM2022	257A	243A	200G	190A	186G	184A										
10	STM1049	204C	196T	194C	188G	185A											
11	STM1016	261G	259T	255C	253T	251C	250G	249C	248C	247C	246G	243A	242C	241T	236T		
12	STM0030	167T	162C	155T	152C	150C	144T	140G	138T	136A	130G						
13	STM3023	202G	199G	190A	185A	181A	169C	167T									
14	STM1106	166A	163A	160C	157C	154A	151A	148C	145C	132G							
15	STM1053	179G	177A	176G	173C	169C											
16	STM0037	95G	93G	88G	87G	83C	80A	78G	76G								
17	STM0019a	214A	212T	209G	206A	203C	201T	200G	198G	193G	184A	181A	176G	166A	161A	159A	157C
18	STM0019b	106T	103T	101A	97T	95G	93G										
19	STM2013	171A	165C	163A	162C	161A	159A	156T	155T	154A	148G	146C					

Tabla 6: Variedades que no concuerdan con el número de alelos esperados para un marcador

COD	Sp.	Marcadores SSR																N° max alelos esperados	N° max alelos presentes			
		STWAX	3012	1104	1031	0031	STGBSS	1052	STPcoA58	2022	1049	1016	0030	3023	1106	1053	0037			0019a	0019b	2013
AYA2	gon	2	2	2	1	1	2	2	1	2	1	2	1	2	1	1	1	1	3	1	2	3
AYA7	cha	3	1	3	1	2	3	1	2	2	1	3	2	3	2	1	2	1	2	4	3	4
AYA13	cha	1	1	2	1	3	2	2	2	1	1	2	2	2	2	1	3	3	4	3	4	
AYA14	cha	3	1	3	1	2	3	1	2	2	1	3	2	3	2	2	1	2	4	3	4	
AYA16	gon	1	2	1	1	1	1	2	1	2	1	1	1	3	2	1	1	2	3	2	3	
AYA17	gon	2	2	1	1	2	2	1	2	1	2	1	2	1	1	1	1	3	1	2	3	
AYA19	cha	3	1	3	1	3	3	2	3	2	1	2	3	1	3	2	1	2	4	3	4	
AYA22	cha	2	1	3	1	3	3	2	3	3	2	2	3	2	3	2	2	2	5	3	5	
PUN2	adg	3	2	3	1	2	3	3	2	3	2	2	3	2	2	1	2	4	6	4	6	
PUN9	ajh	2	1	2	1	2	2	1	2	4	1	2	1	1	1	2	2	2	2	1	2	4
PUN14	adg	2	2	3	1	2	3	2	2	2	1	3	3	2	2	2	2	1	4	5	4	5
CAJ4	adg	2	2	2	1	2	2	2	3	2	1	2	3	1	1	2	1	3	5	4	5	
CAJ7	adg	2	2	2	1	1	2	2	3	2	2	3	3	2	1	2	3	2	5	4	5	
CAJ11	adg	3	2	3	1	3	3	3	2	2	4	2	2	2	2	3	2	2	5	4	5	
CAJ13	adg	4	2	4	1	3	4	2	2	2	1	4	4	4	3	1	2	2	5	4	5	
HUA12	adg	2	1	3	1	3	3	2	3	3	2	2	3	2	1	2	1	2	5	4	5	

Especies (Sp): *S. goniocalyx* = gon, *S. chaucha* = cha, *S. ajanhuiri* = aja, *S. tuberosum subsp. andigena* = adg

5.1.2 Individuos no definidos

Según la caracterización morfológica realizada por los campesinos e ingenieros encargados del Proyecto de Conservación *In situ* (INIEA, 2005 a-e) y corroborando dichos datos con el reconocimiento taxonómico en tubérculo de las 79 variedades nominales analizadas por el Ing. Salas del CIP (Comunicación personal), se determinaron las especies y ploidías esperadas para las muestras utilizadas (Ver Anexo 11.1).

El análisis con los microsatélites demostró que 5 variedades (4 especies *S. stenotomum* y 1 *S. chaucha*) no concuerdan con la especie asignada, debido a que el número de alelos para la mayoría de marcadores excedía al esperado (Ver Tabla N° 7).

Tabla 7: Variedades que no concuerdan con el número de alelos esperados en mas de un marcador.

Marcadores SSR	Individuos no definidos				
	AYA10	AYA12	AYA15	AYA24	HUA10
STWAX	3	2	2	2	2
3012	2	2	2	1	2
1104	3	3	2	2	3
1031	1	2	2	2	1
0031	2	3	2	2	3
STGBSS	3	2	2	2	3
1052	2	2	1	1	2
STPcoA58	1	3	2	3	3
2022	2	2	1	2	3
1049	1	2	1	2	2
1016	3	4	2	1	2
0030	2	3	2	2	3
3023	2	3	3	2	2
1106	1	3	1	2	1
1053	1	1	1	2	3
0037	2	3	3	2	1
0019a	1	1	2	3	2
0019b	2	3	2	3	3
2013	3	5	3	4	3
Sp. Asignadas	stm	cha	stm	stm	stm
N° max alelos esperados	2	3	2	2	2
N° max alelos presentes	3	5	3	4	3
Sp. Posible	cha o stm	cha o adg	stm o cha	cha o stm	cha o stm

Especies (Sp): *S. stenotomum* = stm, *S. chaucha* = cha, *S. tuberosum subsp. andigena* = adg

5.2 Análisis de Diversidad genética

5.2.1 Análisis de agrupamiento

El análisis se realizó utilizando los datos obtenidos de los 19 locus registrados para las 79 variedades.

El primer paso fue el cálculo de la matriz de similitud (Índice DICE), obteniéndose rangos de similitud de 0.25-0.98 y una similitud media de 0.62. De estos resultados observados se puede tener una idea aproximada acerca de la diversidad genética para las muestras analizadas contenida en la información de los microsatélites.

Posteriormente, se realizaron los análisis de agrupamiento, obteniéndose un amplio rango de valor de similitud UPGMA que varía desde 0.41 a 0.98.

El bajo índice de correlación ($r=0.75$) obtenido al comparar la matriz con el método de agrupamiento fue reforzado por medio del análisis de “bootstrap” (800 repeticiones) para ver la consistencia de los grupos formados.

Aunque se usaron 18 marcadores microsatélites repartidos por todo el genoma de la papa y se analizaron 19 locus polimórficos las variedades no lograron formar grandes grupos diferenciados. Sin embargo, se logró determinar 18 pequeños grupos en los cuales la mayoría guardan una relación de nombre, lugar y/o especie (Ver Figura N° 6).

De estos 18 grupos, 8 grupos tienen una gran consistencia (84 a 46 %) según el análisis bootstrap mientras que los 10 grupos restantes presentaron una confianza de 13 a 40%.

Solo 11 variedades de diferentes especies no lograron formar grupos y aquellas que lo hacen se unen con una baja similitud y muy baja confiabilidad (menos de 5% según el análisis bootstrap).

La mayoría de las especies *S. chaucha* y *S. tuberosum subsp. andigena* se agrupan juntas en 6 de estos pequeños grupos, habiendo 5 grupos formados únicamente por *S. tuberosum subsp. andigena* y 3 grupos formados solo por *S. chaucha*. En cuanto a las especies diploides, existe un grupo formado por 2 variedades *S. goniocalyx* y 1 variedad de *S. stenotomum*. La única variedad de *S. ajanhuiri* se agrupó con 4 variedades de *S. curtilobum*, mientras que la otra variedad de *S. curtilobum* se agrupó con 2 variedades de *S. tuberosum subsp. andigena*. Las 2 variedades de *S. phureja* se encuentran agrupadas con 1 variedad de *S. goniocalyx*, 2 variedades *S. tuberosum subsp. andigena* y 1 variedad *S. chaucha*.

Con respecto a las zonas de colecta, existen 5 grupos que se logran formar con variedades procedentes de la misma región. Estas regiones son: Cuzco, Cajamarca y Puno.

Se encontraron 4 variedades posiblemente duplicados: a) 2 variedades *S. curtilobum* de Cuzco (YURAQ K' ETA y AZUL K' ETA) y b) 2 variedades *S. chaucha*, una variedad de Ayacucho (TARAGALLO) y la otra de Cuzco (Q' OE SULLU).

5.2.2 Riqueza alélica

5.2.2.1 Número de alelos por loci

Según Hodgkin en 1995, el beneficio de localizar poblaciones de especies autógamas con altos niveles de riqueza alélica podría ser sustancial si uno desea maximizar la diversidad conservada.

Para los 18 iniciadores utilizados y los 19 locus registrados se obtuvo un total de 166 alelos. El loci que presentó mayor número de alelos fue el STM0019a, con 16 alelos y el que presentó menor número fue el STM1031 y STM1049 con 5 alelos cada uno. De los 166 alelos registrados, Cuzco presentó el mayor número de alelos (130 alelos), seguido de Puno con 120, Ayacucho con 115, Huancavelica con 111 y por último Cajamarca con 105 alelos. La región de colecta que presentó el mayor número de alelos para un locus fue Cuzco, con 11 alelos para el STM1016 (Ver Tabla N° 8).

Cabe resaltar que se analizó un mayor número de muestras de Ayacucho, sin embargo no ha significado que se haya encontrado un mayor número de alelos en esta región; y más aún, solo 4 de los 19 locus analizados presentaron mayor número de alelos en Ayacucho.

5.2.2.2 Alelos comunes y exclusivos

De los 166 alelos caracterizados, 72 son alelos comunes o compartidos para las 5 zonas de colecta, siendo el STM2013 el que presentó el mayor número de alelos comunes.

Se registraron alelos exclusivos (aquellos que solo se encontraron en una de las 5 regiones) en todas las zonas de colecta y para casi todos los iniciadores. Los iniciadores STWAX2, STM1049 y STM1106 no presentaron alelos exclusivos. La región de Puno fue la que presentó mayor cantidad de este tipo de alelos exclusivos y Huancavelica presentó un menor número (Ver Tabla N° 9).

Tabla 8: Número total de alelos presentes para los 19 locus analizados y número total de alelos por zona de colecta

Marcadores SSR	Total de alelos	N° de alelos				
		Ayacucho	Cuzco	Puno	Cajamarca	Huancavelica
1 STWAX	7	6	7	6	5	6
2 3012	7	5	5	3	4	3
3 1104	12	8	8	9	8	9
4 1031	7	5	6	3	2	2
5 S0031	10	6	7	5	7	6
6 STGBSS	11	6	8	9	7	7
7 1052	6	4	5	6	5	5
8 STPcoA58	9	9	7	7	4	5
9 2022	6	3	4	5	5	6
10 1049	5	3	5	5	4	4
11 1016	14	8	11	10	8	9
12 S0030	10	8	7	7	8	7
13 3023	7	4	7	3	4	6
14 1106	9	8	9	6	6	7
15 1053	5	3	4	4	3	3
16 S0037	8	8	6	7	6	5
17 0019a	16	9	10	10	6	9
18 0019b	6	5	6	5	5	4
19 2013	11	7	8	10	8	8
Total	166	115	130	120	105	111
Promedio	8.74	6.05	6.84	6.32	5.53	5.84

Tabla 9: Número de alelos comunes y alelos exclusivos para las 5 zonas de colecta

Marcadores SSR	Alelos comunes	N° de alelos exclusivos				
		Ayacucho	Cuzco	Puno	Cajamarca	Huancavelica
1 STWAX	4	0	0	0	0	0
2 3012	3	2	1	0	0	0
3 1104	5	0	0	0	1	0
4 1031	1	1	0	0	0	0
5 S0031	3	0	0	0	2	0
6 STGBSS	6	0	1	2	1	0
7 1052	4	0	0	1	0	0
8 STPcoA58	4	1	0	0	0	0
9 2022	2	0	0	0	0	1
10 1049	3	0	0	0	0	0
11 1016	6	0	1	0	1	0
12 S0030	4	0	0	0	1	1
13 3023	3	0	0	0	0	0
14 1106	4	0	0	0	0	0
15 1053	3	0	1	1	0	0
16 S0037	4	1	0	0	0	0
17 0019a	3	1	1	2	0	0
18 0019b	3	0	1	0	0	0
19 2013	7	0	0	2	0	0
Total	72	6	6	8	6	2

5.2.3 Contenido de Índice polimórfico (PIC)

El PIC fue calculado para cada iniciador y para las 79 variedades. El valor más alto fue obtenido por el iniciador STM1104 (0.85), el menor valor fue para el STM1031 (0.55) y el valor promedio para los 19 marcadores fue de 0.74 .

Este índice también fue calculado para cada una de las regiones de colecta, en donde se vio que en la mayoría de locus los valores del PIC eran semejantes entre las regiones de colecta. Solo los locus STM2022, STM1031 y STM1049 presentan variaciones sobresalientes entre las 5 regiones. Al igual que el PIC hallado para toda la población, los valores para las regiones son altos (0.85-0.52) aunque se vio que para la región de Ayacucho el iniciador STM1049 presentó un valor muy bajo (0.29) y para Puno, Cajamarca y Huancavelica el iniciador STM1031 presentó un valor de 0.41 (Ver Tabla N° 10).

5.2.4 Índice de Diversidad genética para *S. tuberosum* subsp. *andigena* y *S. chaucha*.

Para el análisis de diversidad genética se tomaron por separado las 42 variedades pertenecientes a la especie tetraploide *S. tuberosum* subsp. *andigena* y las 18 variedades de la especie triploide *S. chaucha*.

Para el caso de *S. tuberosum* subsp. *andigena*, el valor más alto fue de 0.85 para el marcador STM1016, el valor más bajo fue de 0.44 dado por el STM1031 y el valor promedio de diversidad fue de 0.74.

En el caso de *S. chaucha*, el valor mas alto fue de 0.84 para el STM1106, el más bajo fue 0.38 dado por el STM1049 y el valor promedio de diversidad fue de 0.70 (Ver Tabla N° 11).

Tabla 10: Contenido de índice polimórfico para la población total y para cada región de colecta.

Marcador	Contenido de índice Polimórfico - PIC					
	Total	Ayacucho	Cuzco	Puno	Cajamarca	Huancavelica
1 STWAX	0.77	0.74	0.78	0.75	0.73	0.77
2 3012	0.59	0.55	0.61	0.52	0.59	0.52
3 1104	0.85	0.80	0.84	0.83	0.81	0.85
4 1031	0.55	0.52	0.69	0.45	0.43	0.43
5 0031	0.71	0.68	0.72	0.66	0.67	0.74
6 STGBSS	0.84	0.79	0.84	0.84	0.79	0.84
7 1052	0.77	0.74	0.73	0.79	0.77	0.74
8 STPcoA58	0.78	0.79	0.79	0.74	0.70	0.72
9 2022	0.67	0.53	0.68	0.71	0.64	0.74
10 1049	0.59	0.29	0.62	0.59	0.66	0.68
11 1016	0.84	0.77	0.85	0.80	0.83	0.85
12 0030	0.84	0.84	0.80	0.79	0.84	0.78
13 3023	0.68	0.65	0.74	0.60	0.66	0.72
14 1106	0.83	0.83	0.84	0.73	0.76	0.81
15 1053	0.68	0.66	0.69	0.64	0.65	0.67
16 0037	0.73	0.70	0.71	0.73	0.73	0.66
17 0019a	0.81	0.76	0.78	0.83	0.71	0.83
18 0019b	0.71	0.65	0.73	0.67	0.70	0.68
19 2013	0.83	0.78	0.83	0.83	0.83	0.84
Promedio	0.74	0.69	0.75	0.71	0.71	0.73

Tabla 11: Índice de diversidad (Nei, 1973) para las dos especies más representativas de la población muestreada.

Marcador	D G	
	adg	cha
1 STWAX	0.77	0.74
2 3012	0.58	0.55
3 1104	0.84	0.81
4 1031	0.44	0.67
5 S0031	0.74	0.69
6 STGBSS	0.83	0.81
7 1052	0.79	0.75
8 STPcoA58	0.78	0.78
9 2022	0.67	0.50
10 1049	0.63	0.38
11 1016	0.85	0.76
12 S0030	0.84	0.80
13 3023	0.66	0.66
14 1106	0.82	0.84
15 1053	0.67	0.69
16 S0037	0.74	0.58
17 0019a	0.80	0.78
18 0019b	0.71	0.65
19 2013	0.84	0.77
Promedio	0.74	0.70

Especies (Sp): *S. chaucha* = cha, *S. tuberosum subsp. andigena* = adg

VI. DISCUSIÓN

6.1 Número máximo de alelos amplificados por locus

6.1.1 Iniciadores Multilocus

El caso de iniciadores que amplifican varios loci en simultaneo (multilocus) para especies de papa ya ha sido descrito anteriormente. Milboume y colaboradores en 1998 describieron el hecho para variedades de papa tetraploide. Para el caso específico del marcador STM0019 de papa, la presencia de dos regiones bien diferenciadas ya ha sido reportado por Andrade (2001) y Ames (2003) donde demuestran que estas regiones pueden producir bandas de muy buena calidad, lo que también fue evidenciado en el presente trabajo.

Los loci duplicados serían formados debido a una transcripción reversa del ARN mensajero y al parecer esta duplicación sería la más típica de las secuencias no funcionales de los organismos. Otros eventos que posiblemente dan origen a estas secuencias duplicadas serían por “crossing over desigual” como es el caso de la familia de la globina humana o por elementos móviles o transposones. (Ganal y col, 1998; Lagercrantz, 1998)

El incremento de ploidía producido por el iniciador STM2013 según Ghislain, 1999b y Andrade 2001 es debido a que este marcador es multilocus pero parece que esta región duplicada no siempre amplifica o presenta bandas sobrepuestas o presenta gran cantidad de alelos nulos, ya que solo en 13 de las 79 variedades analizadas en este trabajo se pudo evidenciar este aumento.

6.1.2 Individuos no definidos

Una mala clasificación taxonómica sería la explicación más probable para que 5 variedades no concuerden con el número de alelos esperado y por lo tanto no concuerden con la especie asignada. Aunque también deberíamos tomar en cuenta que los agricultores conservacionistas no siembran los cultivos de papa separándolos por especie y no tienen cuidado de la hibridación natural y espontánea que puede sufrir este cultivo (Sevilla, 2004; Brush y col, 1981; Jackson y col, 1978) lo que estaría ayudando a cometer errores en la caracterización. Esta característica natural de la papa de formar híbridos espontáneos interespecíficos podría hacer que fenotípicamente un híbrido sea reconocido como una especie dada debido a que expresa característica de uno de sus progenitores pero que

genotípicamente comparte regiones genómicas de sus dos especies parentales. Un estudio a nivel cromosómico podría ayudar a determinar las causas reales de este fenómeno.

6.2 Diversidad genética encontrada

6.2.1 Análisis de agrupamiento

La baja similitud media obtenida (0.62) del análisis de similitud de las regiones microsatélites permite ver que en la población muestreada existe en promedio menor similitud y por ende mayor variabilidad, también demostrado por el valor amplio de similitud UPGMA (0.41 a 0.98); estos valores reafirman la idea de la existencia de una gran diversidad genética en las muestras analizadas.

Del análisis de agrupamiento se puede ver que los 18 microsatélites utilizados no fueron suficientes para lograr una completa diferenciación en grupos homogéneos de especies y tampoco hubo una buena diferenciación por zona ni por ploidía. Esta falta de diferenciación también se ha visto en los estudios evolutivos filogenéticos realizados por Raker y Sponner en el 2002, donde muchas de las variedades de *S. tuberosum* subsp. *andigena* se mantenían agrupadas junto a sus especies ancestrales diploides. Posiblemente esto se deba a que aun guardan grandes características genotípicas entre las diferentes especies cultivadas, lo que hace muy difícil que puedan ser diferenciadas totalmente por los microsatélites. Quizás con la combinación de caracteres morfológicos y otras técnicas moleculares, como AFLPs, se pueda lograr una mejor caracterización de las variedades conservadas por los agricultores del Proyecto *In situ*.

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. Por otro lado, las 2 variedades duplicadas que provienen de lugares diferentes podrían explicarse por los mecanismo de intercambio de semillas que se efectúan entre los agricultores (trueques, ferias regionales y nacionales) referenciado en los informes del Proyecto de Conservación *In situ* (INIEA. 2005 a-e).

6.2.2 Riqueza alélica

No se encontraron grandes diferencias en el número de alelos registrados para las 5 regiones de colecta, siendo el promedio de alelos por zona de 116.2, lo que nos haría presumir que existe un grado de diversidad semejante entre las regiones analizadas.

Según los estudios evolutivos (Hawkes, 1994; Sponner, 2005), se presume la existencia de un mayor número de variaciones genéticas (polimorfismo) para la zona de colecta de Puno, pero en el presente trabajo la región de Puno quedó en segundo lugar con respecto a riqueza alélica (120 alelos), siendo superado por Cuzco (130 alelos). Lamentablemente 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 (Ver anexo 11.1).

En el caso de Ayacucho, el tener un mayor número de muestras no significó que tuviera un mayor número de alelos. Según este resultado se puede afirmar que conservar el mayor número de variedades en una región no necesariamente significaría 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 en donde se desarrolla. (Hodgkin, 1995)

Por otro lado, casi la mitad de alelos caracterizados son comunes para las 5 regiones de colecta, lo que indicaría que posiblemente estos alelos se encuentran ampliamente distribuidos en toda la zona andina.

6.2.3 Contenido Polimórfico

De los 18 iniciadores microsatélites, 12 tienen niveles de polimorfismo alto (PIC) que van desde 0.71 a 0.85 y los iniciadores restantes presentan un PIC no menor a 0.55. Estos valores nos indican la eficiencia de los microsatélites para analizar la diversidad genética de poblaciones de variedades de papa.

Los valores semejantes de PIC calculados en cada región de colecta y para cada iniciador probablemente se deba a que la frecuencia de los alelos presentes para cada región son muy parecidos entre sí y el índice de contenido polimórfico depende del número de alelos presente y sus frecuencias (Botstein y col., 1980)

La respuesta más probable para que las cinco regiones presenten valores similares de polimorfismo, además de presentar cantidades similares de alelos totales y de alelos exclusivos entre ellos, es la existencia de un flujo de genes constante. Esto quizás debido a

que los agricultores tienden a conservar diversas variedades de papas nativas pero que entre todas ellas comparten las mismas características de utilidad para el agricultor (sabor, tamaño, productividad, etc) que hace que prevalezca un pool de genes “estándar”, además no todos los agricultores mantienen las mismas variedades pero sí todas ellas se encuentran dentro de un solo pool de genes utilitarios. Los intercambios de semillas, muy comunes entre agricultores, estaría impulsando este fenómeno.

6.2.4 Diversidad genética de las especies más representativas

Los valores de diversidad encontrados para las especies analizadas (*S. tuberosum* subsp. *andigena* y *S. chaucha*) son relativamente altos y reafirman el alto grado de diversidad genética mantenido en la población muestreada.

En promedio el valor de diversidad genética es más alto en *S. tuberosum* subsp. *andigena* en comparación con el valor obtenido para *S. chaucha*, probablemente esto se deba a un menor número de muestras analizadas por parte de la especie triploide, pero tampoco podemos descartar la naturaleza genética de la misma especie y sus diferencias de ploidía como responsables del grado de diversidad.

VII. CONCLUSIONES

1. Los marcadores microsatélites demostraron ser eficientes en el análisis de la diversidad genética de variedades de papa nativa (*Solanum* spp.), pero no fueron suficientes para discriminar grupos homogéneos diferenciados por especie o zona de colecta.
2. El análisis de agrupamiento y los valores de diversidad genética obtenidos para las especies *S. tuberosum* subsp. *andigena* y *S. chaucha* indican que existe un alto grado de diversidad genética en la muestra analizada y corrobora los resultados obtenidos de los inventarios y caracterización realizados en las chacras de los agricultores conservacionistas.
3. Existen niveles similares de riqueza alélica y de alelos exclusivos para las cinco regiones de colecta, lo que hace presumir que existe un flujo génico constante entre las cinco regiones de colecta. Además el gran número de alelos compartidos indicaría que estos alelos están ampliamente distribuidos entre los campesinos conservacionistas.

VIII. RECOMENDACIONES

1. Se recomienda realizar estudios a nivel cromosómico con la finalidad de comprender mejor las causas reales del incremento no esperado de alelos y determinar si existen híbridos naturales entre las variedades nativas cultivadas.
2. Se recomienda utilizar los microsatélites en combinación con otros marcadores genéticos (morfológicos y moleculares) para futuros estudios en las variedades de papa nativa mantenidas por los agricultores del proyecto de conservación *In situ* para lograr obtener mayor información sobre el estado de la diversidad genética.
3. Se recomienda continuar los estudios de caracterización molecular mediante los marcadores microsatélites para descartar sesgos mostrados por algún iniciador o por alguna de las regiones muestreadas. Además, para tener una mejor visión del grado de erosión genética que podrían estar sufriendo estos cultivos.

IX. ILUSTRACIONES

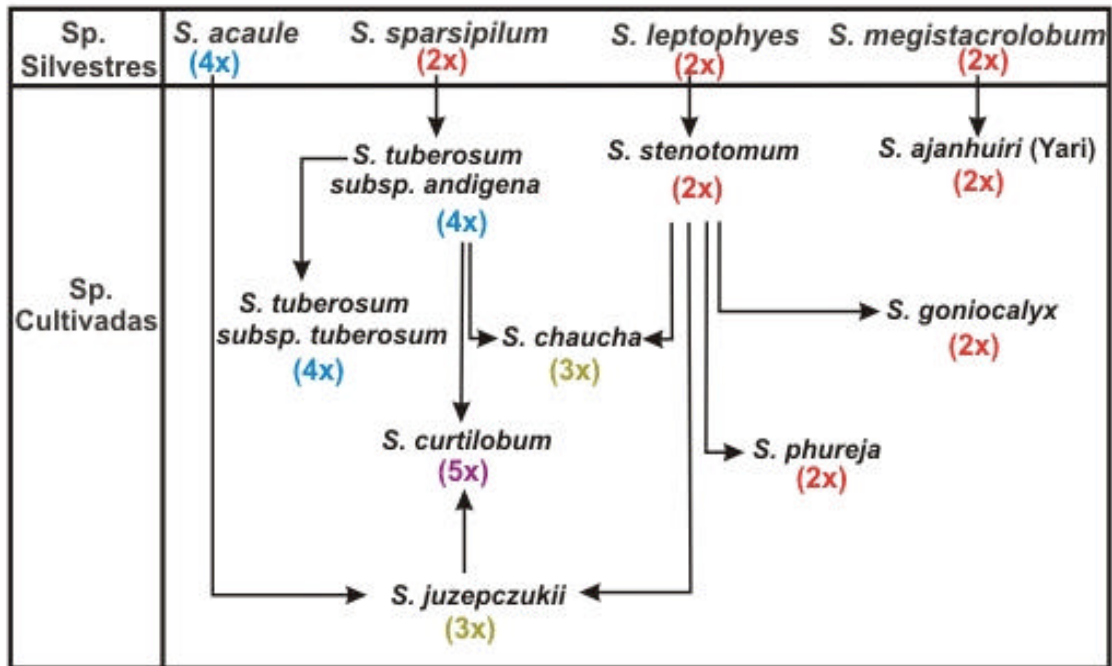


Figura N° 1: Diagrama de evolución de las especies de papa cultivada y sus probables ancestros silvestres (Hawkes 1994a, fig. 1.1)

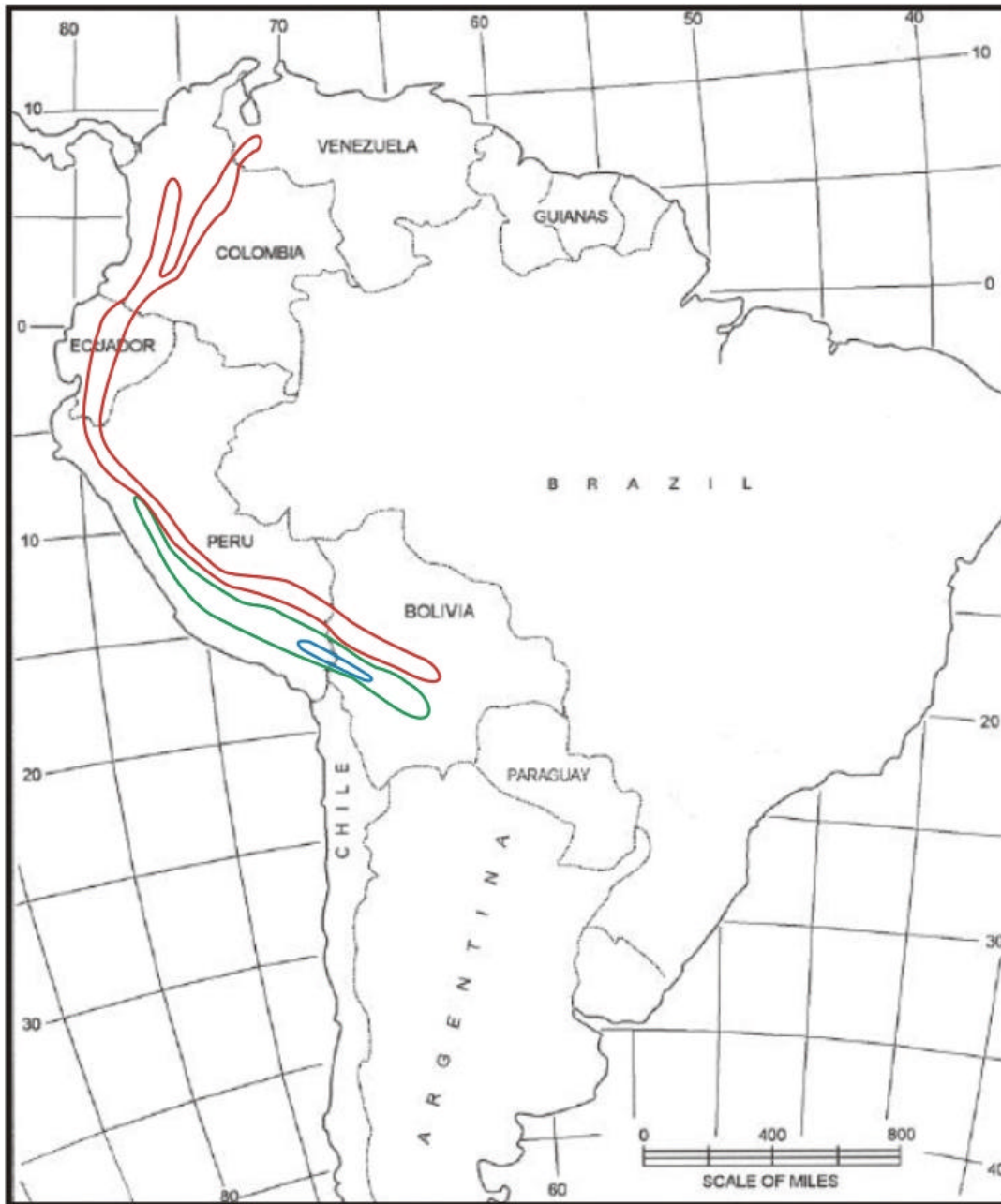


Figura N° 2: Distribución de las especies diploides de papa cultivada
(Hawkes 1990, fig. 1.1)

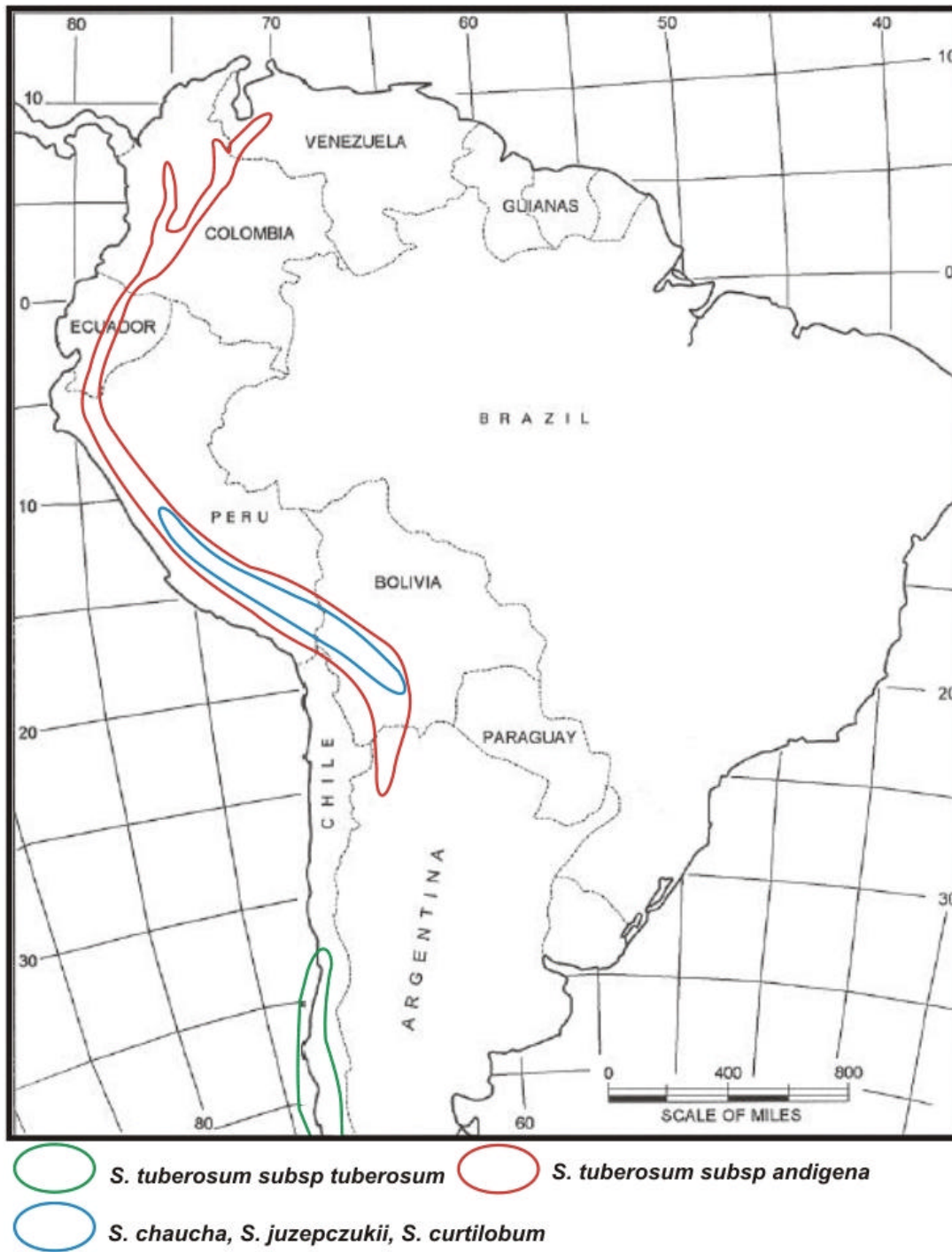


Figura N° 3: Distribución de las especies triploides, tetraploides y pentaploides de papa cultivada (Hawkes 1990, fig. 1.2)

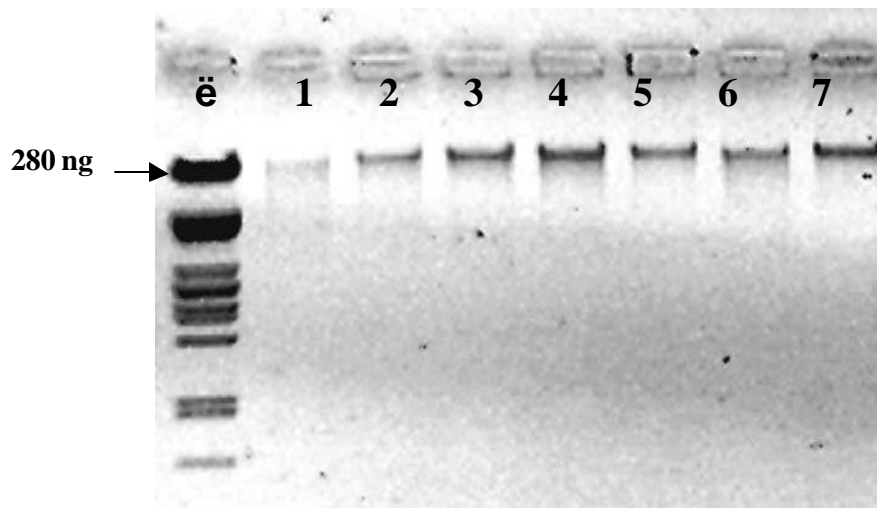


Figura N° 4: Cuantificación de ADN por electroforesis en geles de azarosa, comparando las bandas de ADN con la primera banda del fago ë cortado con Pst I, señalada por la fecha, equivale a 280 ng.

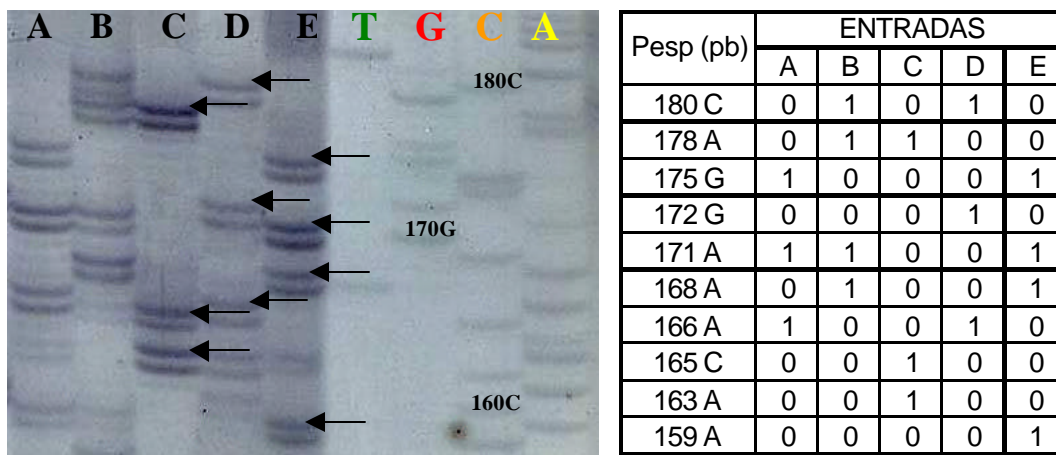


Figura N° 5: Registro de los patrones alélicos. La caracterización alélica es realizada usando la reacción de secuenciamiento del plásmido pUC 18.

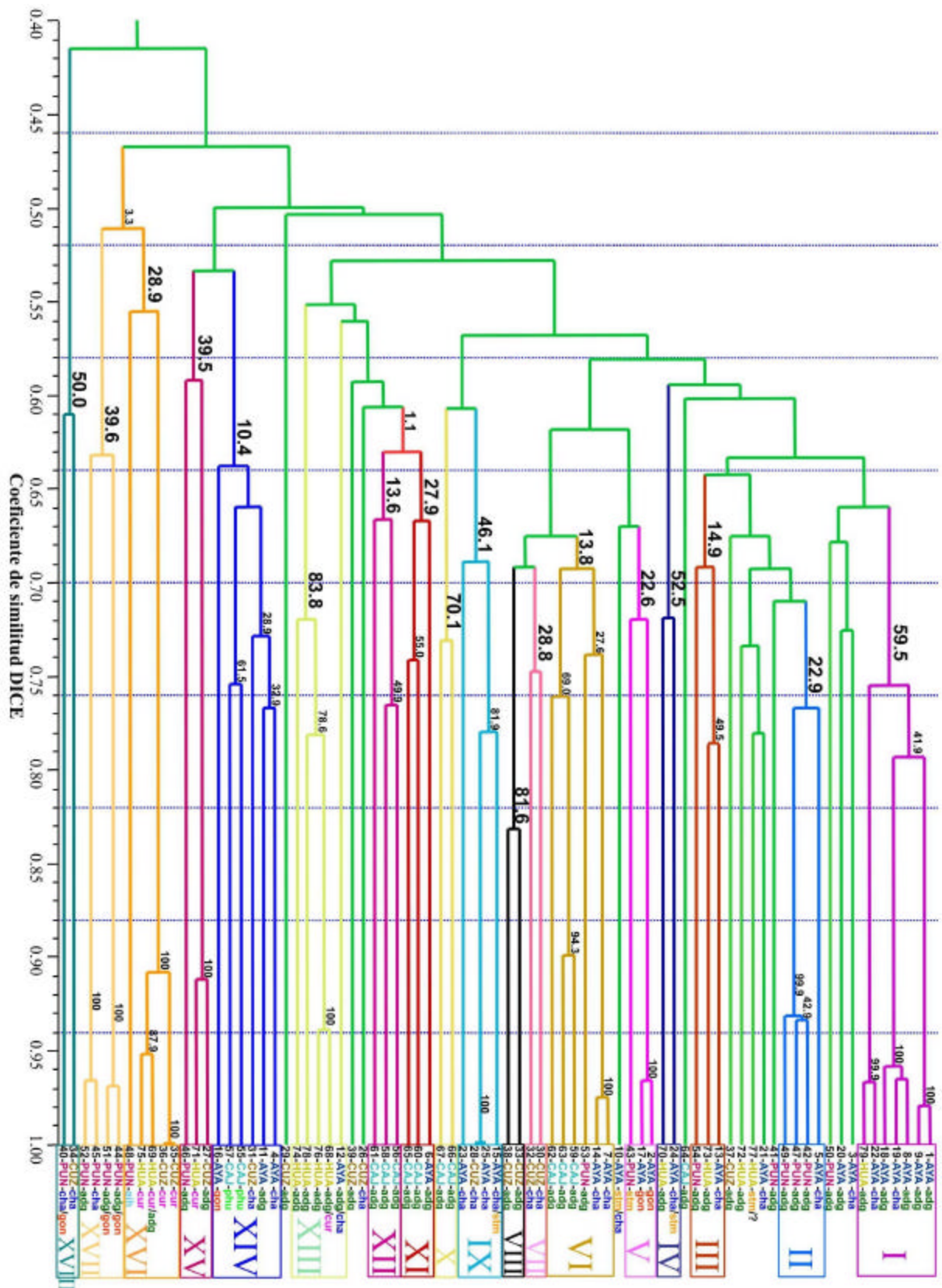


Figura N° 6: Dendrograma obtenido por el método de agrupamiento UPGMA a partir de una matriz de similitud (DICE) de 79 variedades de papa nativa (*Solanum* spp.). Los números romanos indican los grupos mejor formados

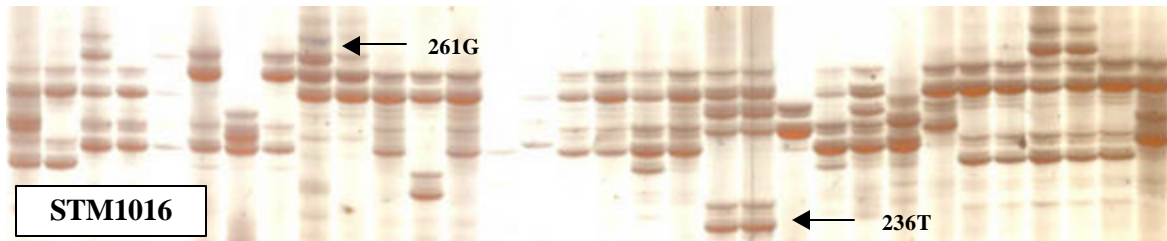


Figura N° 7: Patrón de bandas obtenido por el iniciador STM1016

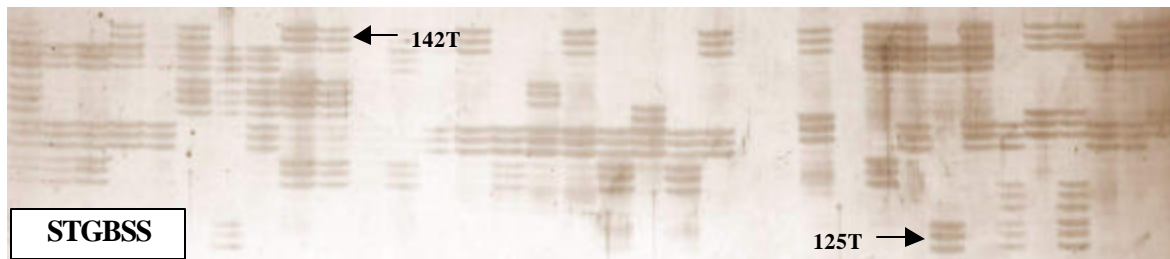


Figura N° 8: Patrón de bandas obtenido por el iniciador STGBSS

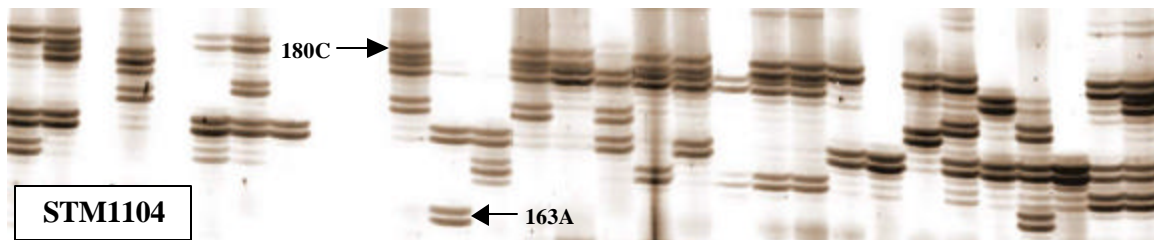


Figura N° 9: Patrón de bandas obtenido por el iniciador STM1104

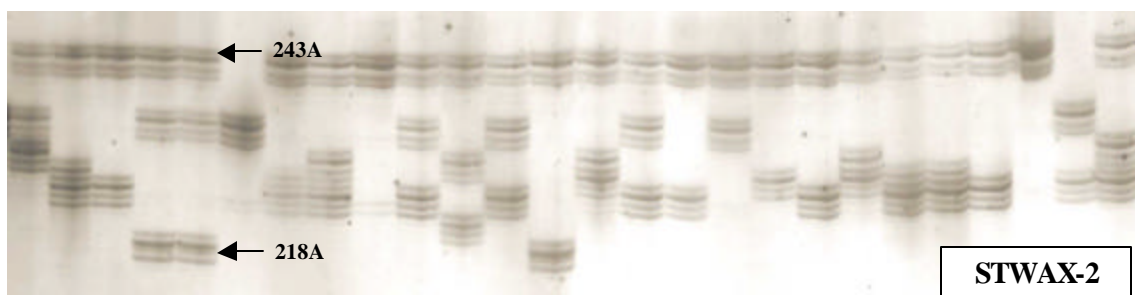


Figura N° 10: Patrón de bandas obtenido por el iniciador STWAX-2

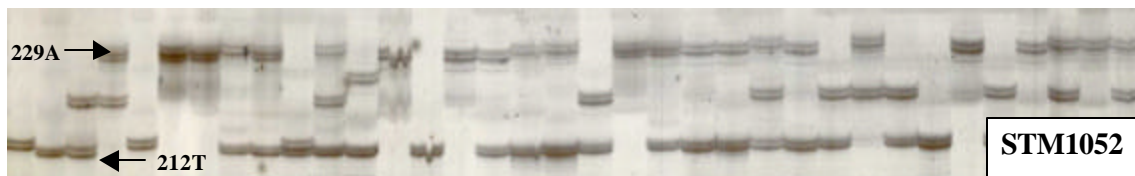


Figura N° 11: Patrón de bandas obtenido por el iniciador STM1052



Figura N° 12: Patrón de bandas obtenido por el iniciador STM1053

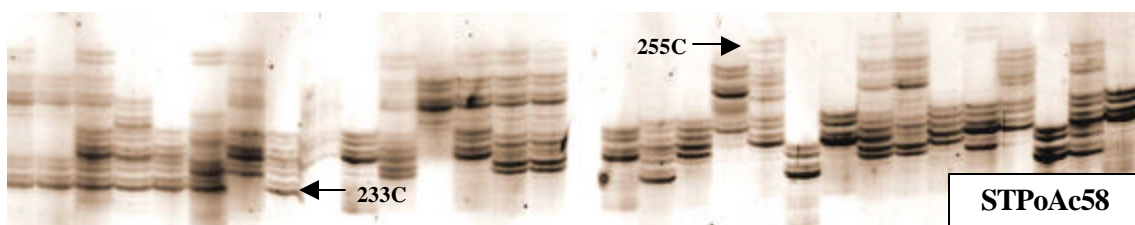


Figura N° 13: Patrón de bandas obtenido por el iniciador STPoAc58

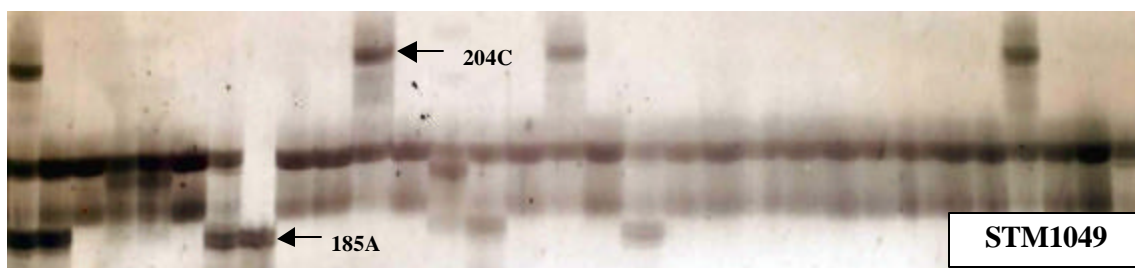


Figura N° 14: Patrón de bandas obtenido por el iniciador STM1049

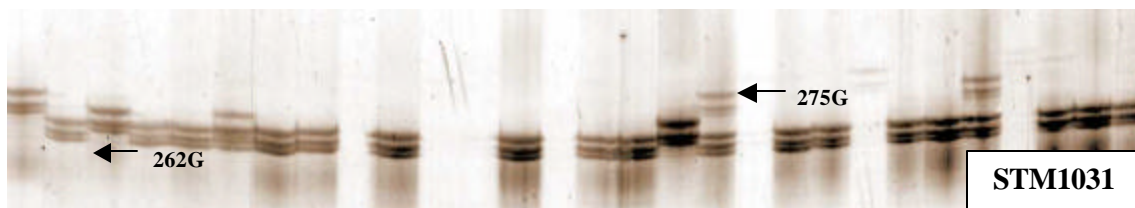


Figura N° 15: Patrón de bandas obtenido por el iniciador STM1031

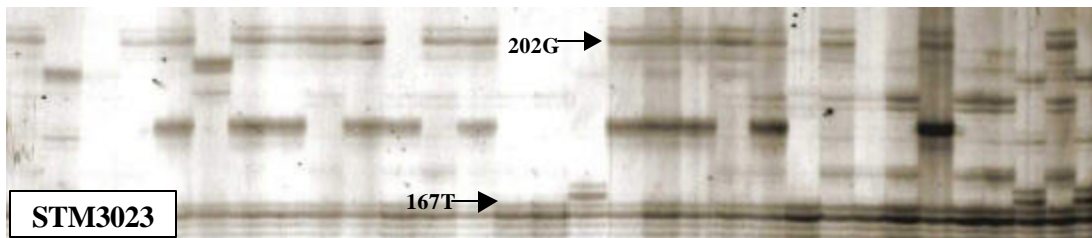


Figura N° 15: Patrón de bandas obtenido por el iniciador STM3023

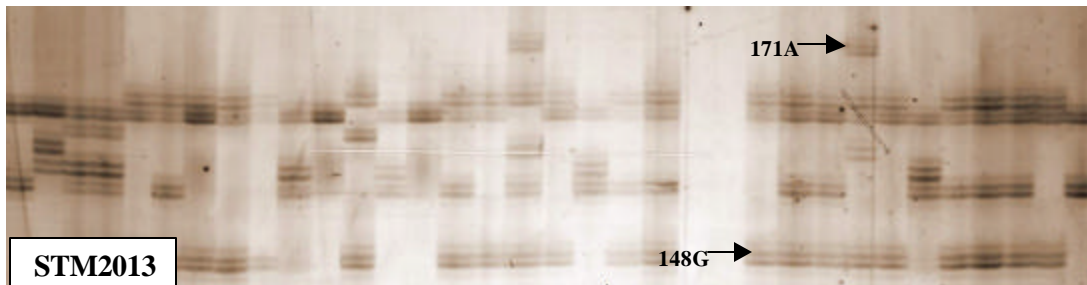


Figura N° 16: Patrón de bandas obtenido por el iniciador STM2013

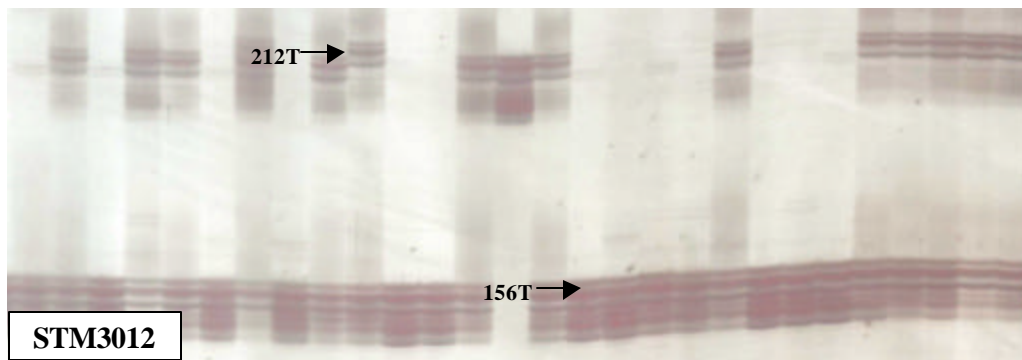


Figura N° 17: Patrón de bandas obtenido por el iniciador STM3012

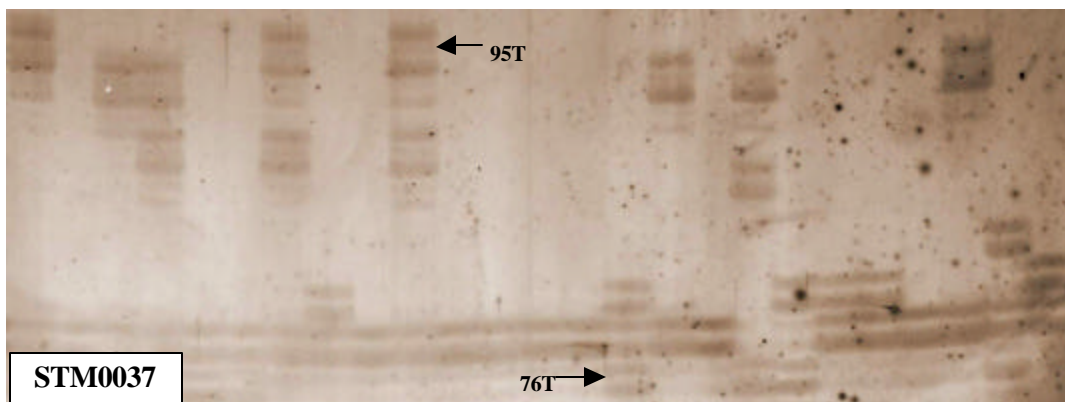


Figura N° 18: Patrón de bandas obtenido por el iniciador STM0037

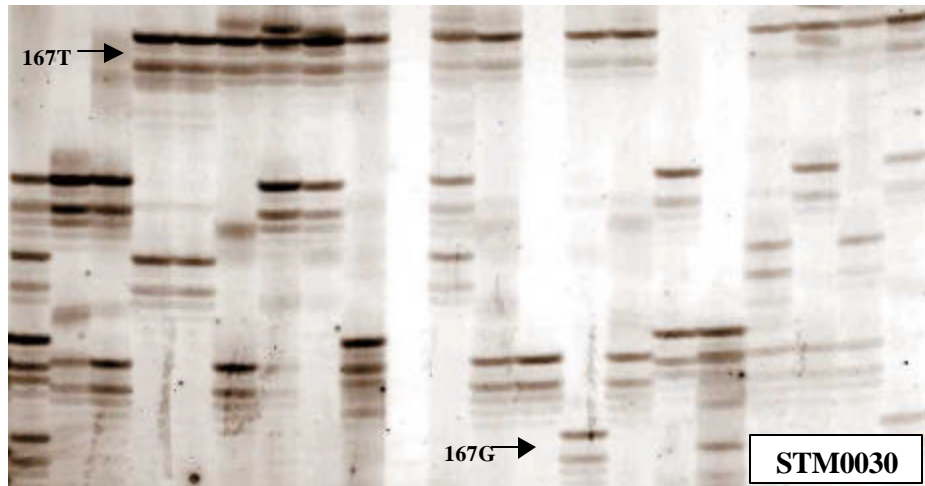


Figura N° 19: Patrón de bandas obtenido por el iniciador STM0030

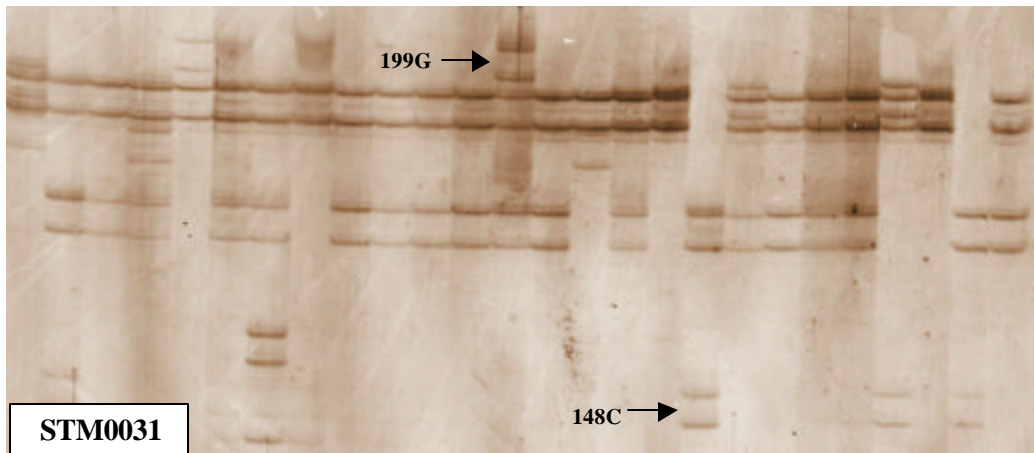


Figura N° 20: Patrón de bandas obtenido por el iniciador STM0031

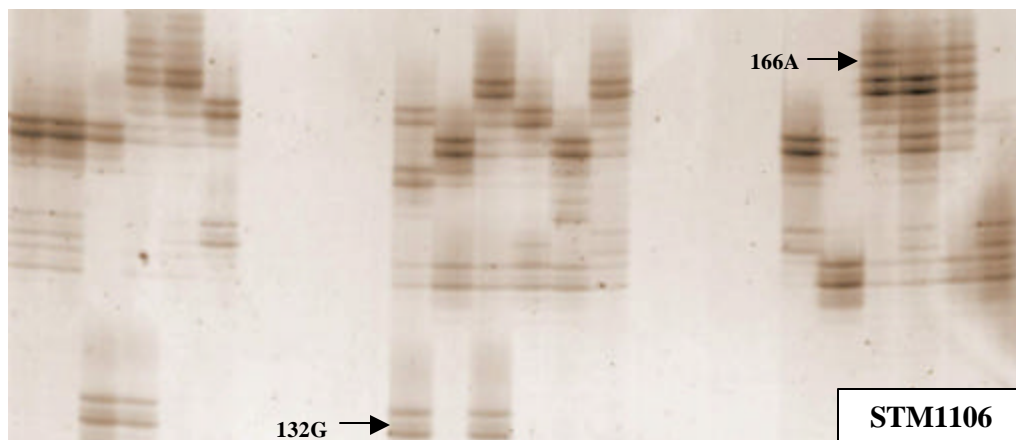


Figura N° 21: Patrón de bandas obtenido por el iniciador STM1106

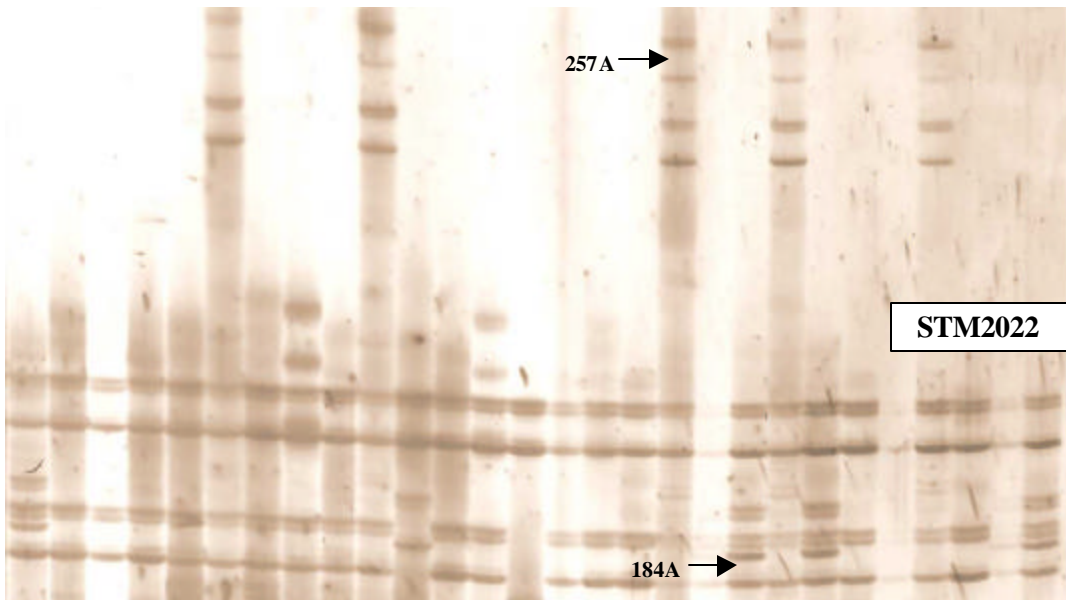


Figura N° 22: Patrón de bandas obtenido por el iniciador STM2022

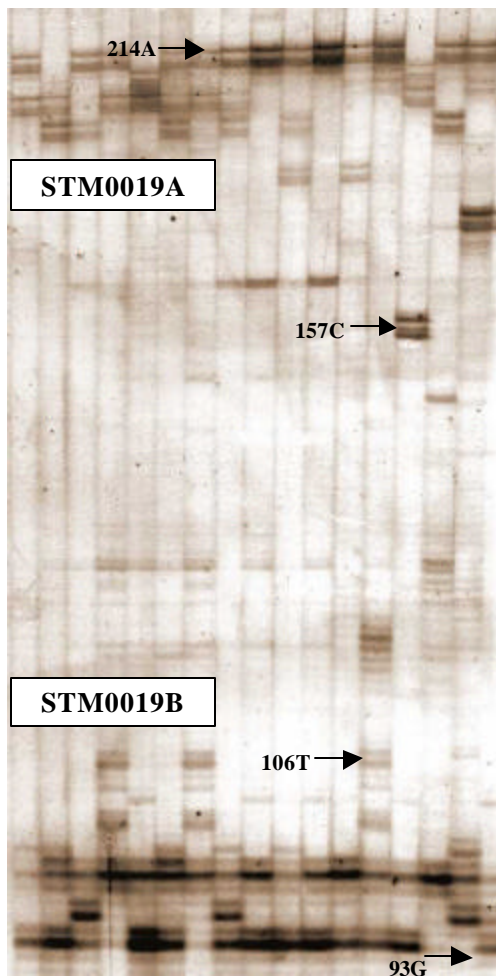


Figura N° 23: Patrón de bandas obtenido por el iniciador STM0019 A y B

X. REFERENCIA BIBLIOGRAFICA

Andrade, D. 2001. . Selección de la colección núcleo para *Solanum phureja* mediante el uso de marcadores microsatélites. Tesis para optar el Título Profesional de Biólogo-UNALM. Lima. pag: 57-71

Ames, M. 2003. Validación de la selección de la colección núcleo de *Solanum tuberosum subsp. andigena* mediante el uso de marcadores microsatélites. Tesis para optar el Título Profesional de Biólogo-UNFV. Lima. pag: 48-63.

Ayad W. G., Hodgkin T., Jaradat, A. & Rao, V. R. 1997. Molecular genetic techniques for plant genetic resources (report of an IPGRI workshop, 9-11 October 1995, Rome, Italy). International Plant Resources Institute, Rome.

Botstein, D., White, R. L., Sholmick, H. & Davus, R. W. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism. American Journal of Human Genetics. 32:314-331.

Brown, A. H. D. & Weir, B. S. 1993. Measuring genetic variability in plant populations. En Tanksley, S.D. and Orton, T.J. (eds) Isozymes en Plant Genetics and Breeding, Part A. Amsterdam, Netherlands: Elsevier.

Brown, A. H. D., 1989. Core Collection: A practical approach to genetic resources management. Genome 31:818-824.

Brush, S. B., Carney, H. J. & Huamán, Z. 1981. Dynamics of Andean potato agriculture. Econ. Bot. 35:70-88. En: Estrada, N., 2000. La biodiversidad en el mejoramiento genético de la papa. Pp:41-42

Centro Internacional de la Papa. 1997. Protocolos de laboratorio de biología molecular-Tipificación genética. Ghislain, M., Zhang, D. & Herrera, M. R (edit). Departamento de Recursos Genéticos. Manual de CapacitaciónCIP. Lima, Perú.

- Dice, L. R. 1945.** Measures of the amount of ecologic association between species. *Ecology*, 26: 297-302.
- Di Rienzo, A, Peterson, A. C., Garza, J. C., Valdes, A. M., Slatkir, M & Fralner, N. B. 1994.** Mutational processes of simple sequence repeat loci in human populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:3166-3170.
- Doyle, J. J. & Doyle, J. L. 1990.** Isolation of DNA from small amounts of plant tissues. *BRL Focus* 12: 13-15, modified at the Forest Biotechnology Lab at NCSU.
- Engler, A. & Prantl, K. 1887–1915.** Die Natürlichen Pflanzenfamilien (2nd edition, 1924). H. Melchior (1964) in Adolf Engler Syllabus der Pflanzenfamilien, 12th edition, II. Band.
- Estrada, R. 2000.** La Biodiversidad en el mejoramiento genético de la papa. PROINPA/CIA/CIP. Bolivia. Pag: 21-88.
- Estoup, A. & Cournet, J. M. 1999.** Microsatellite evolution: differences from populations data. En: Goldstein D. B., Schlotterer, C. (eds), *Microsatellites: evolution and applications*. Oxford University Press Oxford, Pp. 49-65.
- FAO/PNUMA. 1991.** Conservación in situ de recursos genéticos. Proyecto sobre Manejo de Areas Silvestres, Areas Protegidas y Vida Silvestre en América Latina y el Caribe. http://iufro-archive.boku.ac.at/iufro/silvavoc/glossary/7_0es.html
- Feldman, M. W., Bergman, A., Pollock, D. D., Goldstein, D. B. 1997.** Microsatellites genetic distances with range constraints: analytic description and problems of estimation. *Genetics* 145: 207-216.
- Ferreira, M. y Grattapaglia, D. 1998.** Introducción al uso de marcadores moleculares en el análisis genético. 1ed. EMBRAPA-CENARGEN. Brasilia, DF. pag: 55-62, 121-139.

Ganal, M. W., Czehly, R., Hannappel, U., Kloos, D. U., Polley, A. & Ling, H. Q. 1998. Sequencing of cDNA clones from the genetic map of tomato (*Lycopersicon esculentum*) *Genome Res* 8:842-847.

Ghislain, M., Zhang, D., Fajardo, D., Huaman, Z., y Hijmans. R. 1999a. Marker-assisted sampling of the cultivated Andean potato *Solanum phureja* collection using RAPD markers. *Genetic Resources and Crop evolution*, 46 (6): 547-555.

Ghislain, M. 1999b. International Potato Center Subproject Annual Progress Report. Reporting Period: January 1, 1999-December 31, 1999. Subproject title: DNA fingerprinting for the selection of a core collection of cultivated potato.

Ghislain, M., Rodríguez F., Villamón F., Núñez J., Waugh, R. & Bonierbale1, M. 2001. Establishment of microsatellite assays for potato genetic identification In: *Scientist and farmer: partners in research for the 21th century. Technical Progress Report (1999-2000)*. International Potato Center, Lima, Peru. Pag: 167-174.

Grun, P. 1990. Evolution of the cultivated potato: a cytoplasmic analysis. En: Hawkes, J. G. Lester RN and Skelding A D (edit). *The biology and taxonomy of the Solanaceae*. Linnean Society of London, Academy Press, London. Pag: 655-665.

Hancock, J. M. 1999. Microsatellites and other simple sequences: genomic context and mutational mechanisms. En Goldstein D. B. And Schloeterer, C (eds). *Microsatellites: Evolution and applications*. Oxford University Press. Oxford, Pp 1-9.

Hamrick, J. L. y Godt, M. J. W., 1990. Allozyme diversity in plants species. Pp. 46-63. *Plant population genetics, breeding and genetic resources* (A.H.D. Brown, M.T. Clegg, A.L. Kahler and B.S.Weir,eds). Sinauer Associates Inc., Sunderland, Massachusetts, USA.

Hawkes, J. G., 1962. The origin of *Solanum jusepckii* Buk and *Solanum curtilobum* Juz. et Buk. Z. Pflanzenzucht 47: 1-14.

Hawkes, J. G., 1990. The potato evolution biodiversity and genetic resources. Belhaven Press. London UK. Pag: 259.

Hawkes, J. G., 1992. History of the Potato In: The potato Crop. Ed. Paul Harris Chapman & Hall. London. Great Britain.

Hawkes, J. G., 1994. Origins of cultivated potatoes and species relationships. In: Potato Genetics. CAB International University Press UK Cambridge.

Hodgkin, T. 1995. Some current issues in the conservation and use of plant Genetic Resources. In: Molecular Genetic techniques for plant genetic resources. Report of IPGRI workshop 9-11. W.G.Ayad, T. Hodgkin, A. Jaradat & V.R. Rao, (Eds). October 1995. Rome, Italy. p:3-22

Horton, D. 1992. La papa, Producción, comercialización y programas. CIP-Editorial Agropecuaria Hemisferio Sur S.R.L. Montevideo, Uruguay. Pag: 260.

Huamán, Z., Ortiz, R., Zhang, D. & Rodríguez, F. 2000. Isozyme analysis of entire and core collections of *Solanum tuberosum* subsp. andigena potato cultivars. Crop Science 40:273-276

Huamán, Z. 2002a. Tecnologías disponibles para reforzar la Conservación “In situ” de los cultivares de papa tradicionales de los andes. Red Mundial de Científicos Peruanos. Revista electrónica, Año I, Vol. I, N° 1, Dic.2002.

Huamán, Z. y Spooner, D. 2002b. Reclassification of landrace populations of cultivated Potatoes (*Solanum Sect. Petota*). American Journal of Botany 89(6): 947-965.

Instituto Nacional de Investigación y Extensión Agraria. 2005a. Informe Final de cierre del Proyecto “Conservación *In situ* de cultivos nativos y sus parientes

silvestres 2005” . Ing. Llacsá, J. y Ing. Fernández, J. SUBDIRRGG-Estación Experimental Andenes. Cusco-Perú

Instituto Nacional de Investigación y Extensión Agraria. 2005b. Informe Final de cierre del Proyecto “Conservación *In situ* de cultivos nativos y sus parientes silvestres 2005”. Ing. Altamirano, S. SUBDIRRGG-Estación Experimental Canaan. Ayacucho-Perú

Instituto Nacional de Investigación y Extensión Agraria. 2005c. Informe Final de cierre del Proyecto “Conservación *In situ* de cultivos nativos y sus parientes silvestres 2005” Ing. Ruiz, E. SUBDIRRGG-Estación Experimental Ilpa. Puno-Perú

Instituto Nacional de Investigación y Extensión Agraria. 2005d. Informe Final de cierre del Proyecto “Conservación *In situ* de cultivos nativos y sus parientes silvestres 2005”. Ing. Becerra, J. SUBDIRRGG-Estación Experimental Baños del Inca. Cajamarca-Perú

Instituto Nacional de Investigación y Extensión Agraria. 2005e. Informe Final de cierre del Proyecto “Conservación *In situ* de cultivos nativos y sus parientes silvestres 2005” Ing. Cumi.T. SUBDIRRGG-Estación Experimental Santa Ana. Huancayo-Perú

Jackson, M. T., Rowe, P. R. & Hawkes, J. G. 1978. Crossability relationships of Andean potato varieties of three ploidy levels. *Euphytica* 27:541-551. En: Estrada, N., 2000. La biodiversidad en el mejoramiento genético de la papa. Pp:41-42

Jin, L., Macabaus, C., Hallmayer, J., Kimura, A. & Mignot, E. 1996. Mutation rare among alleles at a microsatellite locus: Phylogenetic evidence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 15285-15288.

Karp, A. & Edwards, K. J. 1995. Techniques for the analysis, characterization and conservation of plant genetic resources. In: *Molecular Genetic techniques for*

plant genetic resources. Report of IPGRI workshop 9-11. W.G.Ayad, T. Hodgkin, A. Jaradat & V.R. Rao, (Eds). October 1995. Rome, Italy. p:3-22

Kriglyax, S., Durrett, R.T., Schug, M. D. & Aquadro, C. F. 1998. Equilibrium distributions of microsatellite repeat length resulting from a balance between slippage events and point mutations. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 10774-10778.

Ochoa, C. M. 1999. Las Papas de Sudamérica: Perú. CIP. 1999.

Petes, T. D., Greenwell, P. W., Dominska, M. 1997. Stabilization of microsatellite sequences by variant repeats in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Genetics 146: 491-498.

Powell, W., Machray, G. C. & Provan, P. 1996a. Polymorphism revealed by simple sequence repeats. Trends in Plant Science 1:215–222.

Powell, W., Morgante, M., Andre, C., Hanafey, M., Vogel, J., Tingey, S. & Rafalski, A. 1996b. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SRR(microsatellite) markers for germplasm analysis. Molecular Breeding 2: 225-238.

Promega Corporation. 1996. “Silver sequence DNA sequencing system”. Manual técnico, EEUU, 19 pp.

Provan, J. Powell, W. & Waught, R. 1996. Microsatellite analysis of relationships within cultivated potato (*Solanum tuberosum*). Theoretical and Applied Genetics. Springer-Verlag. 92:1078-1084.

Quevedo, R. 1993. Metodología para el estudio de fincas. Aproximación multivariada. Revista de la Facultad de Agronomía de la Universidad Central de Venezuela. Alcance 44, Maracay, Venezuela. Pp: 115-321.

Lagercrantz, U. 1998 Comparative mapping between *Arabidopsis thaliana* and *Brassica nigra* indicates that *Brassica* genomes have evolved through extensive

genome replication accompanied by chromosome fusions and frequent rearrangements. *Genetics* 150:1217-1228.

Li Wen – Hsiung. 1997. *Molecular Evolution. Chapter 2: Dynamics of genes in Population.* Sinauer associates, INC, Publishers.

Marshall D. R. & Brown A. H. D., 1975. Optimum sampling in genetic conservation. Pp53-80. In *Genetic resources for today and tomorrow* (O.H. Frankel and J.G. Hawkes, eds.) Cambridge University Press. Cambridge, UK

Matsubayashi, M. 1991. Phylogenetic relationships in the potato and its related species. En: *Chromosome engineering in Plants: genetics, breeding and evolution.* Parte B Edited by T. Tsuchiya and P. K. Gupta. Elsevier science Publisher B. V.; Amsterdam – Printed in the Netherlands.

Moxon, E. R. & Wills C. 1999. DNA microsatellites: agents of evolution? *Scientific American*, January: 72-77.

Milbourne, D., Meyer, R., Bradshaw, J.E., Baird, E., Bonar, N., Provan, J., Powell, W. & Waugh, R. 1997. Comparison of PCR-based marker system for the analysis of genetic relationships in cultivated potato. *Molecular Breeding* 3:127-136.

Milbourne, D., Meyer, R., Clins, A. J., Ramsay, Gebhardt, L. D. & Waugh, R. 1998. Isolation, characterization and mapping of simple sequence repeat loci in potato. *Mol. Gen. Genet* (1998) 259: 233-245.

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

Nei, M & Lei, W. H. 1979. Mathematical model of studying genetic variation in terms of restriction endonucleasas. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* 76: 5269-5273

Saiki, R. K., Gelfand D. H., Stoffel S., S. Scharf., R. Higuchi., G.T. Horn, Mulls K. B &. Erlich. H. A 1988. Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239:487-491.

Schlotterer, C. & Tautz D. 1992. Slippage synthesis of simple sequence DNA. *Nucleic Acids Research* 20: 211-215.

Shlotterer , C. & Pemberton, J. 1994. The use of microsatellites for genetic analysis of natural populations. En : Schierwater B, Streit B, Wagner GP and De Salle R (eds). *Molecular Ecology and Evolution. Approaches and applications.* Birkhouse Verlag Basel. Switzerland. Pp. 203-214.

Schmiediche, P., Hawkes, J. G., & Ochoa, C. M. 1982. The breeding of the cultivated potato species *Solanum X juzepczukii* and *S X curtilobum*. II. The resynthesis of *S. X juzepczukii* and *S X curtilobum*.

Sevilla, R. & Holle, M. 2004. *Recursos Genéticos Vegetales.* Ed. Torre Azul. Lima, Perú.

Spunner, D., McLeant, K., Ramsayt, G., Waught, R. & Bryant G. J. 2005. A single domestication for potato based on multilocus amplified fragment length polymorphism genotyping. - *PNAS* - October 11, 2005 - Vol. 102 – N° 4. Pag: 14694– 14699

Smith, J. S. C., Chin, E. C. L., Shu, LI., Smith, O. S., Wall, S. J., Señor, M. L., Mitchell, S. E., Kresovich, S. & Ziegler, J. 1997. An evaluation of the utility of SSR loci as molecular markers in maize (*Zea mays L*): comparisons with data from RFLP andf pedigree. En: *Theoretical and Applied Genetics.* 95:163-173.

Raker, C. M. & Spooner, D. 2002. Chilean tetraploid cultivated potato, *Solanum tuberosum*, is distinct from the Andean populations: Microsatellite data. *Crop Sci.* 42:1451-1458.

Robinson, J. P & Harris, S. A. 1999. Amplified fragment length polymorphisms and Microsatellites: A phylogenetic perspective. Chapter 12 en: Which DNA marker for which purpose? Final compendium of the research project development, optimization and validation of molecular tools assessment of biodiversity in forest trees. Gillet, E. M. (eds), URL.

Rohlf, F. 1993. NTSYS pc. Numerical taxonomy and multivariate analysis system. Exeter Softyware. New York. E.E.U.U.

Tapia, M. E., Alcides, R. 1998. Agrobiodiversidad en La Encañada. Sistematización en la experiencia de la Conservación In Situ de los Recursos Fitogenéticos. Condesan- Aspaderuc- CIP- GTZ. Cajamarca, Lima.

Vargas, C. 1949. Las papas Sudamericanas. Publicación de la Universidad de Cuzco. Perú-Cuzco. Pag: 14-80

Vasquez, A. V. 1988. Mejoramiento genético de la papa. Primera edición Amaru editors – CONCYTEC. Lima-Perú.

Vavilov, N. I. 1951. The origin, variation, immunity and breeding of cultivated plants. In: Selected writings of N. I. Vavilov (transl. By K. Starr Chester) Crónica botanica 13. Pag: 364.

Yap, I. V. Winboot UPGMA bootstrapping for binary data. PHYLIP Copyright 1986-1991 by the University of Washington and Joseph Felsenstein.

Zwettler, D., Viera, C. P. & Schlotterer, C. 2002. Polymorphic microsatellite in *Antirrhinum* (Scrophulariaceae), a genus with low levels of nuclear sequence variability. J. Hered. 93:217-221.

XI ANEXOS

11.1 Lista de procedencia de las 79 variedades nominales de papa nativa (*Solanum* spp.)

N°	COD	VARIETADES	CAMPESINO CONSERV.	Sp.	E.E.	DEPT	PROV.	DIST	COMUN.
1	AYA1	PUKA SUYTU		adg	Canaan	Ayacucho	Huanta	Luricocha	Huayllay
2	AYA2	RUNTUS		gon	Canaan	Ayacucho	Huanta	Luricocha	Huayllay
3	AYA3	TARMEÑA		cha	Canaan	Ayacucho	Huanta	Luricocha	Huayllay
4	AYA4	RIPITA SISAN		cha	Canaan	Ayacucho	Huanta	Luricocha	Huayllay
5	AYA5	PUKA HUAYRO		cha	Canaan	Ayacucho	Huanta	Luricocha	Huayllay
6	AYA6	ALLCCA MENDEZ		adg	Canaan	Ayacucho	Huanta	Luricocha	Huayllay
7	AYA7	QATUM TOQIAQ SUYTU		cha	Canaan	Ayacucho	Huanta	Luricocha	Huayllay
8	AYA8	CUCHIPA ATACAN		adg	Canaan	Ayacucho	Huanta	Luricocha	Huayllay
9	AYA9	PUCA SUYTO	Sergio Chuquicagua Canales	adg	Canaan	Ayacucho	Huamanga	Vichos	Qochapunco
10	AYA10	VACAPA SINGAN	Sergio Chuquicagua Canales	stm	Canaan	Ayacucho	Huamanga	Vichos	Qochapunco
11	AYA11	NOVILLUPA HUAQRAN	Sergio Chuquicagua Canales	adg	Canaan	Ayacucho	Huamanga	Vichos	Qochapunco
12	AYA12	PASPAPAPA	Sergio Chuquicagua Canales	cha	Canaan	Ayacucho	Huamanga	Vichos	Qochapunco
13	AYA13	CHAPINA	Sergio Chuquicagua Canales	cha	Canaan	Ayacucho	Huamanga	Vichos	Qochapunco
14	AYA14	YANA UCHUNCHAKI	Teodoro Chuquicagua Ore	cha	Canaan	Ayacucho	Huamanga	Vichos	Qochapunco
15	AYA15	MURU TUCO	Teodoro Chuquicagua Ore	stm	Canaan	Ayacucho	Huamanga	Vichos	Qochapunco
16	AYA16	PERUANITA	Teodoro Chuquicagua Ore	gon	Canaan	Ayacucho	Huamanga	Vichos	Qochapunco
17	AYA17	QELLU SUNQU	Teodoro Chuquicagua Ore	gon	Canaan	Ayacucho	Huamanga	Vichos	Qochapunco
18	AYA18	YANA LUQSO	Teodoro Chuquicagua Ore	adg	Canaan	Ayacucho	Huamanga	Vichos	Qochapunco
19	AYA19	TUCO PARINRIN	Heracio Quispe Santiago	cha	Canaan	Ayacucho	Huamanga	Vichos	Qochapunco
20	AYA20	YURAQ SUYTO	Heracio Quispe Santiago	adg	Canaan	Ayacucho	Huamanga	Vichos	Qochapunco
21	AYA21	TIULLA	Heracio Quispe Santiago	cha	Canaan	Ayacucho	Huamanga	Vichos	Qochapunco
22	AYA22	LOMUN SUYTO	Heracio Quispe Santiago	cha	Canaan	Ayacucho	Huamanga	Vichos	Qochapunco
23	AYA23	YANA GASPAS	Heracio Quispe Santiago	cha	Canaan	Ayacucho	Huamanga	Vichos	Qochapunco
24	AYA24	MANZANA	Heracio Quispe Santiago	stm	Canaan	Ayacucho	Huamanga	Vichos	Qochapunco
25	AYA25	TARAGALLO	Heracio Quispe Santiago	cha	Canaan	Ayacucho	Huamanga	Vichos	Qochapunco
26	CUZ1	YANA K' USI	Simeon Turpo Quispe	cha	Andenes	Cuzco	Quispicanchi	Ocongate	Paccharita
27	CUZ2	KULLI K' ETA	Simeon Turpo Quispe	adg	Andenes	Cuzco	Quispicanchi	Ocongate	Paccharita
28	CUZ3	Q' DE SULLU	Simeon Turpo Quispe	cha	Andenes	Cuzco	Quispicanchi	Ocongate	Paccharita
29	CUZ4	Q' ERO' ERANA	Florentina Chillihuani Fuentes	adg	Andenes	Cuzco	Quispicanchi	Ocongate	Paccharita
30	CUZ5	YANA MAQT' ACHA	Florentina Chillihuani Fuentes	cha	Andenes	Cuzco	Quispicanchi	Ocongate	Paccharita
31	CUZ6	HUAYRO	Florentina Chillihuani Fuentes	cha	Andenes	Cuzco	Quispicanchi	Ocongate	Paccharita
32	CUZ7	CONEJITO	Florentina Chillihuani Fuentes	cha	Andenes	Cuzco	Quispicanchi	Ocongate	Paccharita
33	CUZ8	YURAQ K' USI	Florentina Chillihuani Fuentes	adg	Andenes	Cuzco	Quispicanchi	Ocongate	Paccharita
34	CUZ9	YURAQ CHIMAKU	Florentina Chillihuani Fuentes	cha	Andenes	Cuzco	Quispicanchi	Ocongate	Paccharita
35	CUZ10	YURAQ K' ETA	Florentina Chillihuani Fuentes	cur	Andenes	Cuzco	Quispicanchi	Ocongate	Paccharita
36	CUZ11	AZUL K' ETA	Florentina Chillihuani Fuentes	cur	Andenes	Cuzco	Quispicanchi	Ocongate	Paccharita
37	CUZ12	LLUTHU RUNT' U	Victor Merma Condori	adg	Andenes	Cuzco	Quispicanchi	Ocongate	Paccharita
38	CUZ13	YURAQ K' UCHIAQ' A	Victor Merma Condori	adg	Andenes	Cuzco	Quispicanchi	Ocongate	Paccharita
39	CUZ14	TIKA BOLE	Victor Merma Condori	adg	Andenes	Cuzco	Quispicanchi	Ocongate	Paccharita
40	PUN1	CUCHICHALLO	Genara Quispe Callacondo	gon	Ilipa	Puno	Chucuito	Pomata	Huancani
41	PUN2	CHIARA IMILLA	Genara Quispe Callacondo	adg	Ilipa	Puno	Chucuito	Pomata	Huancani
42	PUN3	JANCCO IMILLA	Genara Quispe Callacondo	adg	Ilipa	Puno	Chucuito	Pomata	Huancani
43	PUN4	CHIQUINA	Genara Quispe Callacondo	stm	Ilipa	Puno	Chucuito	Pomata	Huancani
44	PUN5	SAKAMPAYA BLANCO	Genara Quispe Callacondo	adg	Ilipa	Puno	Chucuito	Pomata	Huancani
45	PUN6	SUTAMARI OJO MORADO	Genara Quispe Callacondo	cha	Ilipa	Puno	Chucuito	Pomata	Huancani
46	PUN7	CHIARA SAKAMPAYA	Genara Quispe Callacondo	adg	Ilipa	Puno	Chucuito	Pomata	Huancani
47	PUN8	WACA LAJRA	Genara Quispe Callacondo	adg	Ilipa	Puno	Chucuito	Pomata	Huancani
48	PUN9	AJAHIRI	Genara Quispe Callacondo	ajh	Ilipa	Puno	Chucuito	Pomata	Huancani
49	PUN10	CCOMPIS	Genara Quispe Callacondo	adg	Ilipa	Puno	Chucuito	Pomata	Huancani
50	PUN11	WILA IMILLA	Genara Quispe Callacondo	adg	Ilipa	Puno	Chucuito	Pomata	Huancani
51	PUN12	WILA SAKAMPAYA	Genara Quispe Callacondo	adg	Ilipa	Puno	Chucuito	Pomata	Huancani
52	PUN13	SUTAMARI BLANCO	Genara Quispe Callacondo	adg	Ilipa	Puno	Chucuito	Pomata	Huancani
53	PUN14	WALLATA	Genara Quispe Callacondo	adg	Ilipa	Puno	Chucuito	Pomata	Huancani
54	PUN15	KUNURANA	Genara Quispe Callacondo	adg	Ilipa	Puno	Chucuito	Pomata	Huancani
55	CAJ1	TIGRILLA	Daniel Gil	phu	Baños del Inca	Cajamarca	Celendin	Huamin	El Lirio
56	CAJ2	HUAGALINA	Daniel Gil	adg	Baños del Inca	Cajamarca	Celendin	Huamin	El Lirio
57	CAJ3	AMARILLA OJOS AZULES	Daniel Gil	phu	Baños del Inca	Cajamarca	Celendin	Huamin	El Lirio
58	CAJ4	BLANCA OJOS NEGOS	Daniel Gil	adg	Baños del Inca	Cajamarca	Celendin	Huamin	El Lirio
59	CAJ5	LENGUA DE VACA	Daniel Gil	adg	Baños del Inca	Cajamarca	Celendin	Huamin	El Lirio
60	CAJ6	HUAGALINA NORTEÑA	Daniel Gil	adg	Baños del Inca	Cajamarca	Celendin	Huamin	El Lirio

N°	COD	VARIETADES	CAMPESINO CONSERV.	Sp.	E.E.	DEPT	PROV.	DIST	COMUN.
61	CAJ7	CANASTERA	Daniel Gil	adg	Baños del Inca	Cajamarca	Celendin	Huamin	El Lirio
62	CAJ8	CIRILA BLANCA	Daniel Gil	adg	Baños del Inca	Cajamarca	Celendin	Huamin	El Lirio
63	CAJ9	CAPULERA	Daniel Gil	adg	Baños del Inca	Cajamarca	Celendin	Huamin	El Lirio
64	CAJ10	CHOGA	Daniel Gil	adg	Baños del Inca	Cajamarca	Celendin	Huamin	El Lirio
65	CAJ11	AVELLANA	Daniel Gil	adg	Baños del Inca	Cajamarca	Celendin	Huamin	El Lirio
66	CAJ12	SAPA BLANCA	Daniel Gil	adg	Baños del Inca	Cajamarca	Celendin	Huamin	El Lirio
67	CAJ13	BELLA	Daniel Gil	adg	Baños del Inca	Cajamarca	Celendin	Huamin	El Lirio
68	HUA1	YURACC COMUN	Felix Martinez Capani	cur	Santa Ana	Huancavelica	Huancavelica	Yauli	Antacocha
69	HUA2	PAPA SIRI	Felix Martinez Capani	cur	Santa Ana	Huancavelica	Huancavelica	Yauli	Antacocha
70	HUA3	SARAMPION	Felix Martinez Capani	adg	Santa Ana	Huancavelica	Huancavelica	Yauli	Antacocha
71	HUA4	SUITO SHIRE	Felix Martinez Capani	cur	Santa Ana	Huancavelica	Huancavelica	Yauli	Antacocha
72	HUA5	YANA PULOS	Felix Martinez Capani	adg	Santa Ana	Huancavelica	Huancavelica	Yauli	Antacocha
73	HUA6	YURACC PAPA	Felix Martinez Capani	adg	Santa Ana	Huancavelica	Huancavelica	Yauli	Antacocha
74	HUA7	PUCA LLAMAPA NAHUIN	Felix Martinez Capani	adg	Santa Ana	Huancavelica	Huancavelica	Yauli	Antacocha
75	HUA8	YANA PAPA SHIRE	Felix Martinez Capani	cur	Santa Ana	Huancavelica	Huancavelica	Yauli	Antacocha
76	HUA9	YURACC LLUNCHUY HUACCACHI	Felix Martinez Capani	adg	Santa Ana	Huancavelica	Huancavelica	Yauli	Antacocha
77	HUA10	YANA MANUA	Felix Martinez Capani	stm	Santa Ana	Huancavelica	Huancavelica	Yauli	Antacocha
78	HUA11	JALA SUITO	Felix Martinez Capani	adg	Santa Ana	Huancavelica	Huancavelica	Yauli	Antacocha
79	HUA12	PUCA JALA SUITO	Felix Martinez Capani	adg	Santa Ana	Huancavelica	Huancavelica	Yauli	Antacocha

11.2 Características, secuencia y ubicación de los 18 iniciadores SSR

Código	Motivo Repetido	Secuencias 3' - 5'	Cromosoma	T° alineamiento (°C)	Tamaño de alelos (pb)
STM1049	(ATA) ₆	CTACCAGTTTGTGATTGTGGTGG	I	57	184 - 254
		AGGGACTTTAATTGTGGCG			
STM2022	(CAA) ₃ ...(CAA) ₃	GCGTCAGCGATTTCAGTACTA	II	53	184 - 241
		TTTAGTCAACTCCGTGGCG			
STM1053	(TA) ₄ (ATC) ₅	TCGCCATCTTAATGTTC	III	55	168 - 177
		CAACACAGCATGCAGATCATC			
STM3023	(GA) ₉ ...(GA) ₈ ...(GA) ₄	AAGCTGACTTGTGCTGCA	IV	50	177 - 201
		GTCTGGCATTTCATCTAGAGA			
STP ₀ Ac58	(TA) ₁₃	TTGATGAAAGGAATGCAGCTGTGG	V	57	231 - 277
		ACGTTAAAGAAGTGAAGAGTACGA			
STM1031	(AT) ₁₃	TGIGTTTGTGTTTCTGTAT	V	55	265 - 325
		AATTCATCTCATCTCTA			
STM0019	(AT) ₇ (GT) ₁₀ (AT) ₄ (GT) ₄ (GT) ₄	AATAGGTGACTGACTCTCAATG	VI	47	83 - 239
		TTGAAGTAAAAGTCTTAGTATGTG			
STM2013	(TCTA) ₆	TTCGAATTACCCCTGCCC	VII	55	146 - 172
		AAAAAAGAACCACCAGC			
STM0031	(AC) ₅ ...(AC) ₃ (GCAC)(AC) ₂ (GCAC) ₂	CATACCCGACGTACATC	VII	57	155 - 205
		TTCAACCTATCATTGTGTAGT			
STM1016	(TCT) ₉	TTCTGATTTTCATGATGTTCC	VIII	53	262-243
		ATGCTGCCATGTGATGTTG			
STWAX-21	(ACTC) ₈	CCCATAAATACGTGCGATGAGCA	VIII	53	243-224
STWAX-22	GAATGTAGGGAAACATGCATGA				
STM1104	(TCT) ₅	TGATTCCTTGCCTACGTGAATCG	VIII	57	168 - 213
		CAAAGTGTGTGAAGCTGTGA			
STGBSS	(TCT) ₉	AATTCATCTCATCTCTA	VIII	53	142-130
		ATGCTTGCCATGTGATGTTG			
STM1052	(AT) ₁₄ GT(AT) ₄ (GT) ₆	CAATTTCGTTTTTTCATGTGACAC	IX	Td.60-50	268-212
		ATGCCGTAATTGATTTAATACGFAA			
STM3012	(ATT) ₁₃	CAACTCAAACAGCAAGCAAA	IX	57	168 - 213
		GAGAAATGGCCACAAAAACA			
STM1106	(TC) ₅ (AC) ₆ AA(AC) ₇ (AT) ₄	TCCAGCTGATTGTTACGTTG	X	55	142 - 196
		ATGCCAATCTACTGTCATGG			
STM0037	(ATT) ₁₃	AATTTAACTTAGAAGATTAGTCTC	XI	53	75 - 99
		ATTGTGTTGGTATGATA			
STM0030	Compuesto (GT) ₅ (GC) ₃ (GT) ₈	AGAGATCGATGAAAAACCGT	XII	53	122 - 188
		GTGGCATTGTGATGGATT			

11.3. Reactivos para la Extracción de ADN

1. Tampón de Extracción CTAB 2X

Stock	Final	100ml
CTAB	2%	2g
NaCl 5M	1.4M	28ml
EDTA 0.5 M, pH 8.0	20mM	4ml
Tris HCl 1M, pH 8.0	100mM	10ml
PVP	1%	1g
H ₂ O destilada		c.p.s. 100ml

El tampón puede ser almacenado a temperatura ambiente por tiempo indefinido.

2. Tampón de extracción CTAB al 10%

Stock	Final	100ml
CTAB	10%	10g
NaCl	0.7M	4.09g
EDTA 0.5 M, pH 8.0	20mM	4ml
Tris HCl 1M, pH 8.0	100mM	10ml
H ₂ O destilada		c.p.s. 100ml

3. Tampón T₁₀E₁

Stock	Final	1000ml
10mM	10ml	
Tris HCl 1M, pH 8.0	1mM	2ml
H ₂ O destilada		c.p.s. 1000ml

Esterilizar en autoclave y almacenar a temperatura ambiente

4. ARNasa 10mg/ml

Stock	Final	5ml
ARNasa	10mg/ml	50mg
Tris HCl 1M, pH 8.0	10mM	50µl
NaCl 5M	15mM	15µl
H ₂ O destilada		

11.4. Reactivos para electroforesis de Agarosa

1. Preparación de geles de azarosa 1 %

Stock	Final	100ml
Agarosa	1 %	1g
TBE 1X	1X	100ml
EtBr 10mg/ml	0.1 µg/ml	1 µl

2. Tampón de carga para geles de agarosa (SALB 10X)

Stock	Final	100ml
Azul de bromofenol	0.15%	75 mg
Xilen cianol	0.15%	75mg
Naranja G	0.20 %	100mg
Sucrosa	60%	30g
TBE 10X	0.5X	2.5ml
H ₂ O destilada MilliQ		c.p.s. 50ml
Iniciar com 10ml de água destilada MilliQ		

3. Peso molecular (pb) de los colorantes en geles de agarosa

Colorante	Agarosa desde 0.5 %	Agarosa hasta 1.4%
Xilen cianol	4 Kb	4 Kb
Azul de bromofenol	0.3 Kb	0.3 Kb

11.5. Preparación de geles de Poliacrilamida

1. Tampón TBE 10X

Stock	Final	100ml
Tris-base	90mM	108g
Acido bórico	5.5%	55g
EDTA 0.5M, pH 8.0	20mM	40ml
H ₂ O destilada MilliQ		c.s.p. 1000ml

2. Solución stock de poliacrilamida al 40%

Stock	1000ml
Acrilamida	380gr
Bisacrilamida	20gr
H ₂ O destilada MilliQ	c.s.p. 1000ml

* Preparar mezcla en cámara extractora, usar mascara y lentes protectores.

3. Solución de acrilamida al 6%, Urea /M

Stock	Final	1000ml
Stock de poliacrilamida al 40%	6%	150ml
UREA	7M (42%)	420g
TBE 10X	1X	100ml
H ₂ O destilada MilliQ		c.s.p 1000ml

4. Tampón de caraga para geles de poliacrilamida

Stock	Final	1000ml
Dye		100µl
EDTA 0.2M	0.01M	500µl
Formamida		9.6ml

5. Colorante Dye

Stock	Final	1000ml
Xilen cianol	5%	50mg
Azul de bromofenol	5%	50mg
H ₂ O destilada MilliQ		

6. **Peso molecular (pb) de los colorantes en geles de poliacrilamida**

Colorante	Acrilamida 6 %	Acrilamida 10 %
Xilen cianol	110 pb	55 pb
Azul de bromofenol	25 pb	10 pb

7. **Preparación de las placas de vidrio y del gel de poliacrilamida**

a. **Preparación de la placa de vidrio**

Siempre que se prepare un gel es necesario tratar la placa pequeña con una solución que mantenga el gel adherido a la placa de vidrio. La placa es limpiada con alcohol y papel toalla antes de aplicar la solución adherente

La solución adherente es preparada mezclando 7 ul de bind silano (adherente) y 7 ul de ácido acético glacial en 1.5 ml de alcohol al 95%.

Esta solución es impregnada en la placa de vidrio usando papel toalla y es esparcido a través del vidrio en un solo sentido y después en otro tratando de no dejar ningún espacio en la superficie del vidrio sin haber sido impregnada por la solución. Dejar secar durante 30 a 45 minutos.

b. **Preparación de la placa de vidrio grande:**

Esta placa de vidrio necesita ser tratada con una solución que repela el gel de poliacrilamida. Al igual que la placa pequeña la placa grande es limpiada con alcohol y papel toalla antes de ser tratada con la solución repelente (Dimetil diclorosilano)

Esta solución también será impregnada en la placa de vidrio usando papel toalla y es esparcido a través del vidrio en un sentido y después en el otro tratando de no dejar ningún espacio en la superficie del vidrio sin haber sido impregnada por la solución.

c. **Preparación del gel de secuenciación:**

El sistema es ensamblado de la siguiente manera:

- Colocar los espaciadores laterales sobre la placa de vidrio grande. Sobre ella colocar la placa de vidrio pequeño de modo que los lados tratados con la solución adherente y repelente estén cara a cara.
- Entre las dos placas de vidrio colocar cinta adhesiva en la parte inferior y en los lados para evitar dejar rendijas por donde se pudiera escurrir la solución de poliacrilamida.

- Asegurar el extremo inferior y laterales del sándwich mediante abrazaderas metálicas.
- Colocar los peines en la parte superior los cuales no deben ser ni flojos ni muy ajustados para evitar dañar el gel al momento de retirarlos o que las muestras filtren de una posición a otra en el caso de que estuvieran muy flojos.
- Medir 60 ml de solución de acrilamida, agregar 34 ul de TEMED y 340 ul de persulfato de amonio al 10%, agitar suavemente. Retirar el peine, levantar el sándwich por una las esquinas superiores, de modo que el sistema se encuentre inclinado. Verter la solución por el lado mas bajo lentamente, con cuidado de no formar burbujas. Una vez que la solución alcanza el fondo del sándwich bajar lentamente la esquina con la cual se sujeta, hasta colocarla al mismo nivel que la otra, y a medida que se va llenando bajarlo hasta que finalmente quede horizontal.
- Una vez lleno el sándwich colocar el peine con el lado recto hacia dentro, entre las dos placas de vidrio y hasta la mitad de la altura del peine. Dejar polimerizar por un tiempo mínimo de 2 horas.

d. Instalación y pre-electroforesis del gel:

Antes de colocar el sándwich en la cámara de electroforesis se deben retirar los sujetadores y el separador inferior del sistema, así como los residuos del gel.

Colocar el gel armado en la cámara de electroforesis vertical, con la placa pequeña mirando hacia el interior de la cámara. Ajustar con los sujetadores y colocar los tampones de corrida, en la parte inferior del gel 400 ml de TBE 1X y en la superior 700 ml de TBE 0.5X.

Con la ayuda de una jeringa retirar las burbujas que se formaron en la parte superior e inferior del sándwich. Una vez libres de burbujas dejar pre-correr el gel a 500 voltios durante 30 minutos. Luego de este tiempo volver a limpiar el bolsillo superior del gel y colocar el peine con los dientes hacia el interior del gel para que de ese modo delimitar los espacios en donde las muestras serán colocadas.

11.6 Marcador de peso Molecular – Secuenciamiento para pUC 18

1. Reacción de secuenciamiento

Master mix	1 Rx
H2O destilada MilliQ	1.4 μ l
pUC 18	7.0 μ l
Buffer	5.0 μ l
Iniciador	3.6 μ l
Taq polimerasa	1.0 μ l

2. Preparación de la placa de reacción de secuenciamiento

Rotular 4 tubos para PCR con el tipo de nucleótido que le corresponda (G, A, T, C) y colocar 2 μ l de cada ddNTPs en cada tubito. Añadir 4.5 μ l de master mix a cada tubito

3. Protocolo de amplificación de secuenciamiento del plásmido pUC 18

Ciclo	Temperatura (°C)	Tiempo (minutos)
1 ciclo	95	2.0
51 ciclos	95	0.5
	42	0.5
	70	1.0
Final	4	

Una vez finalizado el programa de amplificación, agregar la mitad de volumen amplificado de la solución “Stop solution” para detener la reacción de secuenciamiento y que a la vez funcione como tampón de carga. Denaturar a 95 ° C por 5 minutos y cargar al gel (Promega Corporation)