

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

E.A.P DE CIENCIAS BIOLOGICAS

**Análisis de la diversidad genética de papas nativas
(Solanum sec. Petota) de la comunidad de Chahuaytire,
integrante del Parque de la Papa (Pisaq-Cusco), y de las
papas nativas repatriadas por el Centro Internacional de
la Papa usando marcadores microsatélites**

TESIS

para optar el Título Profesional de Biólogo con mención en Microbiología y
Parasitología

AUTOR

Percy Rojas Domínguez

Lima-Perú

2007

ÍNDICE

DEDICATORIA

AGRADECIMIENTO

1. RESUMEN

1

ABSTRACT

2. INTRODUCCIÓN

2.1 PRESENTACIÓN

3

2.2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

4

2.3 JUSTIFICACIÓN

5

2.4 OBJETIVOS

6

2.4.1 OBJETIVO GENERAL

2.4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3. ANTECEDENTES

3.1 DIVERSIDAD DE LAS ESPECIES VEGETALES ANDINAS

7

3.2 SISTEMÁTICA Y CONSERVACIÓN DE LA DIVERSIDAD DE PAPA

8

3.3 EL CULTIVO DE PAPA Y SU IMPORTANCIA

10

3.4 MANTENIMIENTO DE LA DIVERSIDAD EN LOS CAMPOS DE LOS
AGRICULTORES

11

3.5 EL PARQUE DE LA PAPA

12

3.6 REPATRIACIÓN DE PAPAS NATIVAS

15

3.7 MARCADORES MOLECULARES

16

3.8 MICROSATÉLITES

17

3.9 ESTUDIOS PREVIOS DE CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE
PAPAS CULTIVADAS

18

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 MATERIALES

4.1.1 MATERIAL BIOLÓGICO

20

4.1.1.1 MATERIAL VEGETAL

4.1.1.2 ADN Y ENZIMAS

4.1.1.3 INICIADORES

4.1.2 IMPLEMENTOS DE LABORATORIO

22

4.1.2.1 MATERIALES

4.1.2.2 EQUIPOS

4.1.2.3 MATERIAL QUÍMICO

4.2 MÉTODOS

4.2.1 ENSAYO EXPERIMENTAL

23

4.2.1.1 TOMA DE MUESTRAS PARA EXTRACCIÓN DE ADN

4.2.1.2 AISLAMIENTO DE ADN GENÓMICO

4.2.1.3	CUANTIFICACIÓN DEL ADN	
4.2.1.4	AMPLIFICACIÓN DE LOS MICROSATÉLITES	
4.2.1.5	DETECCIÓN DE LOS SEGMENTOS MICROSATÉLITES AMPLIFICADOS	
4.2.1.6	REGISTRO DE ALELOS	
4.2.2	ANÁLISIS DE DATOS	25
4.2.2.1	RIQUEZA ALÉLICA Y ALELOS PRIVADOS	
4.2.2.2	ÍNDICE DE DIVERSIDAD GENÉTICA (ID)	
4.2.2.3	ANÁLISIS DE AGRUPAMIENTO	
4.2.2.4	ANÁLISIS DE VARIANZA MOLECULAR	
5.	RESULTADOS	
5.1	POLIMORFISMO DE LOS LOCI MICROSATÉLITES EN PAPAS NATIVAS DE CHAHUAYTIRE Y CIP REPATRIADAS	29
5.2	RIQUEZA ALÉLICA Y ALELOS EXCLUSIVOS DE PAPAS NATIVAS DE CHAHUAYTIRE Y CIP REPATRIADAS	30
5.3	ÍNDICES DE DIVERSIDAD GENÉTICA DE PAPAS NATIVAS DE CHAHUAYTIRE Y CIP REPATRIADAS	33
5.4	ANÁLISIS DE AGRUPAMIENTO DE PAPAS NATIVAS DE CHAHUAYTIRE Y CIP REPATRIADAS	
5.5	ANÁLISIS DE VARIANZA MOLECULAR	36
6.	DISCUSIÓN DE RESULTADOS	
6.1	POLIMORFISMO DE LOS LOCI MICROSATÉLITES EN PAPAS NATIVAS DE CHAHUAYTIRE Y CIP REPATRIADAS	45
6.2	DIVERSIDAD GENÉTICA DE LAS PAPAS NATIVAS DE CHAHUAYTIRE Y CIP REPATRIADAS	
6.3	ANÁLISIS COMPARATIVO DE LAS PAPAS NATIVAS DE CHAHUAYTIRE Y CIP REPATRIADAS	46
7.	CONCLUSIONES	48
8.	RECOMENDACIONES	49
9.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50
10.	ANEXOS	
ANEXO 1.	LISTADO DE PAPAS NATIVAS DE LA COMUNIDAD DE CHAHUAYTIRE	63
ANEXO 2.	LISTADO DE PAPAS NATIVAS REPATRIADAS POR EL CIP A LA COMUNIDAD DE CHAHUAYTIRE	65
ANEXO 3.	SECUENCIAMIENTO DEL PLÁSMIDO pUC 18	68
ANEXO 4.	PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DEL PLÁSMIDO pUC 18 A MEDIANA ESCALA, ADAPTADO DE QUIAGEN (1997)	72
ANEXO 5.	ESTIMACIÓN DEL TAMAÑO DE LOS ALELOS SSR POR MEDIO DEL SECUENCIAMIENTO DE PARTE DEL PLÁSMIDO pUC 18	74

ANEXO 6.	FENOTIPO MOLECULAR DE LOS 10 LOCI SSR EVALUADOS EN GELES DE POLIACRILAMIDA AL 6%	75
ANEXO 7.	PREPARACIÓN DE REACTIVOS	
	A. SOLUCIONES PARA EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO	79
	B. PCR DE LOS MICROSATÉLITES	81
	C. ELECTROFORESIS EN GELES DE AGAROSA Y POLIACRILAMIDA	82
	D. TINCIÓN CON NITRATO DE PLATA	84

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi gratitud a los que con su valioso aporte académico, profesional y aliento constante contribuyeron en la realización de este trabajo de investigación.

Al Ing. R. Gómez por la oportunidad, al Dr. W. Roca por la confianza, a M. Ames por su paciencia. Igualmente a L. Fernández por las enseñanzas, a R. Schibli por las lecciones, a J. Biondi y G. Gonzáles por su amistad y compañerismo, a C. Zorrilla por su comprensión y apoyo incondicional.

Agradezco también a M. Martin por su generosa ayuda, a O. Carrillo, W. Rodríguez y C. García por su franca amistad, a J. Huamán por su perspicacia, a G. Rossel por los consejos oportunos, a M. Vargas, K. Soto, K. Vivanco y K. Quinteros por compartir gratos momentos, a D. Carbajulca por su sincera amistad y a todo el personal supervisor, técnico y científico de la División de Biodiversidad y del ABL del CIP.

Asimismo expreso mi reconocimiento a los profesores de Ciencias Biológicas y condiscípulos de la Base 96 por todo lo aprendido y vivido en aulas sanmarquinas. Mi gratitud especial para los profesores J. León y M. A. Talledo por su invaluable ayuda; para los miembros del Jurado de Tesis, profesores P. Ramírez, A. Cano, H. Sánchez por sus valiosas sugerencias y a mi asesora P. Woll, gracias infinitas por sus acertados consejos y apoyo constante.

DEDICATORIA

Con mucho amor, aprecio y respeto a mis hermanos:
Irma, Marleni, Edwin, Soledad y a mis queridos padres
Celia y Práxides, cuyos consejos y ejemplo de lucha y
trabajo constante me guían e impulsan siempre.

1. RESUMEN

Se caracterizaron 195 cultivares de papa nativa (*Solanum* sec. *Petota*) colectadas en la comunidad de Chahuaytire y 246 papas nativas repatriadas por el Centro Internacional de la Papa (CIP) a la Asociación de Comunidades del Parque de la Papa (ACPPD) utilizando 10 loci microsatélites (STM0019a, STM0019b, STPoAc58, STM0037, STM0030, STM1104, STM1052, STM1106, STM2013, STM2022), localizados en 9 de los 12 cromosomas de la papa, empleando 9 pares de iniciadores del kit de caracterización molecular de papa desarrollados en el CIP.

La caracterización molecular permitió diferenciar un perfil de alelos microsatélite único en el 93.33% de las papas de Chahuaytire y en el 92.68% del grupo de papas repatriadas por el CIP. Se identificaron un total de 114 y 130 alelos en los loci evaluados, con un índice de diversidad promedio de 0.762 y 0.776 y un total de 6 y 20 alelos exclusivos en las papas de Chahuaytire y en el grupo de papas repatriadas por el CIP, respectivamente.

El agrupamiento de cultivares de papa se hizo mediante el algoritmo UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean, por sus siglas en inglés) aplicado a la matriz de similitud obtenida con el coeficiente de Jaccard. Este análisis evidenció que no hay una diferenciación genética respecto a la procedencia del material evaluado. El Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) produjo resultados similares, evidenciando que la variación molecular entre las papas de Chahuaytire y las papas repatriadas por el CIP fue de sólo el 0.73% (p -valor=0.05), e indica una constitución genética básicamente similar en ambos grupos. La principal fuente de variación molecular, 99.27% (p -valor = 0.05), ocurrió entre cultivares dentro de cada grupo. Sin embargo, la presencia de 6 alelos exclusivos encontrados en las papas de Chahuaytire sugiere que parte de la diversidad genética encontrada en esta comunidad no se encuentra representada en las 246 papas repatriadas por el CIP al Parque de la Papa.

La alta diversidad genotípica de papas nativas y la presencia de alelos exclusivos sugiere una diversidad genética de particular importancia que mantienen los campesinos conservacionistas en esta comunidad.

Palabras clave: papas nativas, microsatélites, diversidad genética, Parque de la Papa.

ABSTRACT

195 native potato cultivars collected in Chahuaytire community and 246 native potatoes repatriated to Potato Park Communities Association (ACPDP) by the International Potato Center (CIP) were characterized using nine primer pairs that amplify the ten most polymorphic microsatellite loci from the potato genetic identification kit (STM0019, STP_oAc58, STM0037, STM0030, STM1104, STM1052, STM1106, STM2013, STM2022), located in 9 of the 12 chromosomes of potato.

The molecular characterization differentiated the 93.33% of the native potatoes from the Chahuaytire community and the 92.68% of repatriated native potatoes from CIP. 114 and 130 alleles and average diversity index between 0.762 and 0.776 were obtained in the Chahuaytire community and the repatriated potatoes, respectively.

The clustering of potato cultivars was performed using the UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean) method applied to similarity matrix obtained with Jaccard coefficient. Clustering analysis revealed that no differentiation according to origin was found. Similarly, Analysis of Molecular Variance (AMOVA) revealed that the molecular variation between evaluated groups was 0.73% (p -value=0.05), indicating a basically similar genetic constitution between both groups. The main source of molecular variation, 99.27% (p -value=0.05), was found within the native potatoes inside groups. However, the finding of 6 private alleles in the native potatoes from Chahuaytire suggests that some genetic diversity maintained in the Chahuaytire native potatoes is not represented in the 246 repatriated potatoes from CIP.

The great genotypic diversity and the private alleles of Chahuaytire native potatoes indicate that conservationist farmers in this community maintain a distinctive genetic diversity.

Key words: native potatoes, microsatellites, genetic diversity, Potato Park.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 PRESENTACIÓN

El Perú es uno de los mayores centros mundiales de diversidad de recursos genéticos con 182 especies domesticadas de plantas nativas y 5 de animales, ocupando el quinto lugar entre los países megadiversos del planeta; siendo reconocido por ello como uno de los centros de origen de la agricultura y de la ganadería (Brack, 2002). Pruebas arqueológicas señalan que las papas, otros tubérculos y raíces fueron primero domesticados en los Andes de Sudamérica hace ocho a diez mil años y luego de una ardua tarea de selección y domesticación, los agricultores nativos mantienen y conservan hoy en día una gran variedad de cultivares diferentes de papa, principalmente con fines de autoconsumo (Engels, 1970; Hawkes, 1988; Brush, 1991). Ésta agrobiodiversidad es manejada y mantenida por acción de los actores en el medio rural, principalmente campesinos, y conservada en bancos de germoplasma por acción de la sociedad civil y del Estado (CONAM e INIA, 2003).

El departamento del Cusco, al sur del Perú, es considerado uno de los microcentros de mayor diversidad de plantas andinas, en especial de la papa (Ortega, 1997) y se encuentra dentro del área donde posiblemente se originó la papa cultivada a partir de sus progenitores silvestres (Spooner et al., 2005). En comunidades del distrito de Písaq y otras aledañas en la provincia de Calca, el principal cultivo es la papa (Cosío et al., 1981). Estudios morfológicos y citológicos (Ochoa, 1964), colectas (Hawkes et al., 1972), registros y descripciones fenotípicas (Vargas, 1949; Cosío, 1998) revelan que en éstas zonas las familias campesinas manejan una gran diversidad de papas nativas; sin embargo, hay carencia de estudios sobre la constitución genética de esos cultivares.

Para obtener una adecuada caracterización de las papas nativas, es necesario realizar evaluaciones morfoagronómicas de las variedades más importantes, usos e información etnobotánica, además de conteos

cromosómicos, métodos de separación electroforética de marcadores químicos y de caracterización molecular del ADN (Cosio, 1998).

Los marcadores de ADN son métodos utilizados para cuantificar la diversidad en especies de plantas cultivadas (Kumar, 1999) y están empleándose como estrategias complementarias a los enfoques tradicionales de análisis de diversidad genética. Son ventajosos porque examinan las variaciones a nivel del ADN, excluyendo todas las influencias medioambientales; el estudio se realiza en cualquier etapa de crecimiento, usando cualquier parte de la planta y con pequeñas cantidades de material (Rao, 2004).

Los marcadores moleculares microsátélites o de secuencias simples repetidas (SSR) son numerosos y se encuentran ampliamente distribuidos en el genoma de las plantas, utilizándose en estudios de diversidad genética por el elevado polimorfismo que generan (Ferreira y Grattapaglia, 1998). Con la genotipificación basada en el uso de estos marcadores de ADN se evidenciaron diferencias entre clones de papa cultivada (Provan et al., 1996; Schneider & Douches, 1997; Ghislain et al., 2000; Coombs et al., 2004), convirtiéndose en una técnica de caracterización molecular y estimación de relaciones genéticas confiable y eficiente.

2.2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Tradicionalmente la gran diversidad de papas nativas es identificada por los campesinos andinos, quienes utilizan una amplia nomenclatura y pueden reconocer nominalmente con cierta precisión la gran variabilidad de papas que manejan en sus campos de cultivo (Quiros et al., 1990; Zimmerer, 1991a; Brush y Taylor, 1992; Ortega, 1997). Esta diversidad es endémica en el ámbito comunal e incluso es común observar de 10 a 12 genotipos diferentes por familia (Brush et al., 1995). Sin embargo, hasta el momento la diversidad genética de papas nativas ha sido poco estudiada en algunos lugares reconocidos como microcentros de diversidad de papas nativas.

2.3 JUSTIFICACIÓN

El registro de cultivares nativos usando marcadores moleculares es una actividad reciente e importante para el monitoreo, la protección y el estudio de la diversidad genética de los recursos genéticos. Las papas nativas en las comunidades del Parque de la Papa son un recurso de mucho valor económico y social para los campesinos conservacionistas que continuamente utilizan esta diversidad. Por esta razón, es esencial estudiar la diversidad y las relaciones genéticas de las papas nativas, manejadas y conservadas en Chahuaytire, una comunidad integrante del Parque de la Papa.

El nuevo conocimiento científico generado para esta comunidad servirá como elemento de consulta para adoptar eficientes estrategias para la conservación de la agrobiodiversidad de papa mantenida *in situ*. Asimismo el registro de las papas nativas estudiadas podría ser usado en inventarios o catálogos con fines de protección de este valioso cultivo tradicional.

2.4 OBJETIVOS

2.4.1 OBJETIVO GENERAL:

Analizar la diversidad genética de cultivares de papa nativa (*Solanum* sec. *Petota*) de la comunidad de Chahuaytire (Pisacusco), integrante del Parque de la Papa y de las papas nativas repatriadas por el Banco de Germoplasma del CIP a este Parque usando marcadores microsatélites (SSR).

2.4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- i.** Tipificar genéticamente cultivares nativos de papa de la comunidad de Chahuaytire y de las papas nativas repatriadas por el CIP, usando la información alélica obtenida con 10 loci microsatélites.
- ii.** Evaluar la diversidad genética de las papas nativas de Chahuaytire y de las papas nativas repatriadas por el CIP.
- iii.** Comparar la diversidad genética de los cultivares de papa nativa de la comunidad de Chahuaytire con las papas nativas repatriadas, actualmente manejadas en el Parque de la Papa.

3. ANTECEDENTES

3.1 DIVERSIDAD DE LAS ESPECIES VEGETALES ANDINAS

La región andino-amazónica de América del Sur es uno de los 8 centros de diversidad descritos por Vavilov y una de las cuatro áreas del mundo donde independientemente se desarrolló la agricultura (Hawkes, 1991; Alfaro, 1997; Zamudio, 2005). Por sus especiales condiciones ecológicas exhibe una gran riqueza vegetal que han dado por resultado, con la intervención del hombre, una gran diversidad de cultivos (NAP, 1989). Este centro de diversidad y desarrollo de especies vegetales nutritivas es reconocido como reservorio importante de material genético para el futuro (Sperling & King, 1990; Tapia, 1993). Entre las especies más importantes de recursos genéticos seleccionados y domesticados por los habitantes andinos, se conocen aquellas que producen tubérculos como la papa (*Solanum* sec. *Petota*), oca (*Oxalis tuberosa*), olluco (*Ullucus tuberosus*), mashua (*Tropaeolum tuberosum*), y los que producen raíces como maca (*Lepidium meyenii*), yacón (*Smilax sonchifolia*), arracacha (*Arracacia xanthorrhiza*), achira (*Canna edulis*), ahípa (*Pachyrhizus ahípa*) y mauka (*Mirabilis expansa*) (Alfaro, 1997; Hermann & Heller, 1997).

Es importante señalar que la distribución de la variabilidad de éstas especies no es uniforme en toda la franja andina; sino que se localizan en los denominados “microcentros”, zonas ecológicas con características medio ambientales, sociales y culturales favorables para la conservación natural de la biodiversidad (García et al., 2003). En éstas zonas se han identificado una gran riqueza genética de tubérculos y raíces andinas, pero también se han detectado una serie de riesgos que afectan negativamente a su conservación, tales como la ocurrencia de enfermedades y plagas, que podrían provocar eventualmente pérdida de variedades (Ortega, 1997), la influencia de costumbres externas y por lo tanto la pérdida de tradiciones y costumbres locales; las preferencias de hábitos de consumo moderno, el desconocimiento de las variedades nativas por las nuevas generaciones, la presión del mercado por variedades más comerciales y el éxodo de los agricultores a las ciudades (Brush, 1986; Dueñas 1992; Zimmerer, 1992; Brush, 2002; Sevilla y Holle, 2004).

3.2 SISTEMÁTICA Y CONSERVACIÓN DE LA DIVERSIDAD DE PAPA

Taxonómicamente todas las especies de papa cultivada y sus parientes silvestres están clasificadas en la familia *Solanaceae*, género *Solanum*, sección *Petota* (Spooner et al., 2004). El número cromosómico básico (x) en *Solanum* es 12, y los niveles cromosómicos en la sec. *Petota* varían de $2n = 2x = 24$, $2n = 3x = 36$, $2n = 4x = 48$, $2n = 5x = 60$, hasta $2n = 6x = 72$ (Huamán, 1986; Spooner et al., 2004).

En el origen de las especies cultivadas han intervenido las especies silvestres formando híbridos o como ancestros directos de las papas cultivadas (*Figura 1*), y de acuerdo a las teorías planteadas hasta el momento, las especies serían: *S. stenotomum* (STN), *S. phureja* (PHU), *S. goniocalix* (GON) y *S. x ajanhuiri* (AJH) entre las diploides (2x); *S. x chaucha* (CHA) y *S. x juzepczukii* (JUZ) entre las triploides (3x); *S. tuberosum* es tetraploide (4x) con dos subespecies: *S. tuberosum* subsp. *tuberosum* (TBR) y *S. tuberosum* subsp. *andigenum* (ADG); y *S. x curtilobum* (CUR) es la única especie pentaploide (5x) (Hawkes 1990; Ochoa, 1999; Spooner et al., 2005). De todas estas especies, solamente *Solanum tuberosum* subsp. *tuberosum* es cultivada en todo el mundo; las demás especies están restringidas a la región andina, siendo *S. tuberosum* subsp. *andigenum* la papa cultivada de mayor importancia en esta región (Huamán, 1998; Ortiz, 2001).

Huamán & Spooner (2002) considerando los orígenes híbridos, múltiples orígenes y dinámicas evolutivas de continua hibridización, reconocen a todas las poblaciones de papas cultivadas como una sola especie: *Solanum tuberosum*, conformada por ocho grupos de cultivares: Grupo Ajanhuiri, Grupo Andigenum, Grupo Chaucha, Grupo Chilotanum, Grupo Curtilobum, Grupo Juzepczukii, Grupo Phureja y Grupo Stenotomum. Dentro de este último se incluyó a *S. goniocalix*. Sin embargo éstas agrupaciones propuestas están todavía en discusión (Núñez et al., 2006).

3.3 EL CULTIVO DE PAPA Y SU IMPORTANCIA

La papa se cultiva en más países, en más zonas ecológicas, y más sistemas agrícolas que cualquier otro cultivo en el mundo (Hawkes, 1991) y junto con el trigo, arroz y maíz, proporciona el 60 por ciento de la energía alimentaria mundial (FAO, 2004); asimismo es superior a estos cultivos en producción de proteína y energía por unidad de tiempo y hectárea. Su contenido proteínico es valioso debido al alto contenido de aminoácidos esenciales, lo cual no es común en las proteínas de otras plantas, excepto la soya. Además es una fuente importante de vitamina C y de minerales, especialmente potasio (Estrada, 2000).

En los Andes peruanos, los campesinos cultivan la papa considerando las siguientes categorías: i) variedades nativas; ii) variedades nativas seleccionadas, aquellas sembradas individualmente para su comercialización por ser de muy buena calidad culinaria (harinosas); viii) variedades amargas, para su uso en forma de chuño o moraya y iv) variedades modernas o también llamadas mejoradas (Brush, 1991; Quiros et al., 1992).

Las variedades nativas se siembran a lo largo de la serranía entre los 2500 y 4300 metros de altura (Ugent y Ochoa, 2006), presentan una enorme diversidad de características y se les reconoce como recurso genético valioso para la alimentación del futuro (Brush, 1995). Precisamente, la papa nativa se constituye en el cultivo principal de los Andes peruanos, contribuyendo con casi la mitad de la dieta y un producto de importante valor comercial puesto que aproximadamente el 40 % de la papa en los Andes es comercializada (Brush, 1991).

Las papas nativas se caracterizan por presentar altos contenidos de sólidos, siendo más nutritivas y rindiendo mejor que las papas comunes en las preparaciones culinarias (INCOPA, 2003). Mención aparte merece el uso que se les da a las papas amargas, que constituyen casi el 70% de la dieta de los pobladores en la meseta peruano boliviana en los meses de agosto y marzo; y que son utilizadas para obtener chuño negro y chuño blanco -moraya (quechua) o tunta (aymara)- (Arbizu & Tapia, 1994); que luego de eliminar los glicoalcaloides solubles en agua, por tratamientos sucesivos de congelamiento

y deshidratación, se convierten en valiosa fuente de energía y en una excelente manera de conservar y asegurar su sustento (Quiros et al., 1992). Así, por ejemplo el chuño blanco provee valores de fósforo superiores a los proporcionados por los productos de consumo masivo como el pan, el arroz y los fideos, además de un buen contenido de calcio y hierro (Fonseca y Julca, 2005).

3.4 MANTENIMIENTO DE LA DIVERSIDAD EN LOS CAMPOS DE LOS AGRICULTORES

En el pasado prehispánico existieron culturas como Chavín, Tiahuanaco, Chibcha, Wari, Nazca, Mochica, y finalmente la Inca cuyos grupos humanos se modificaron hasta la formación de “ayllus” o familias campesinas. Éstas comunidades desarrollaron una agricultura autóctona con sus propias tecnologías agrícolas y conocimientos tradicionales sobre conservación y manejo de una enorme variabilidad de recursos genéticos (Tapia, 1992; 1993). En el presente, existen más de cinco mil comunidades campesinas en los Andes peruanos que preservan aún esta sabiduría a través de generaciones, ya sea por tradición oral, intercambio de experiencias y por el trabajo especial de selección, distribución y cuidado de las semillas (Tapia y De la Torre, 1997).

Sin embargo, en las comunidades alto andinas a la par que los campesinos adoptan las nuevas tecnologías agrícolas y la introducción de variedades modernas de cultivo, persisten las prácticas tradicionales de manejo de la diversidad por los beneficios potenciales que ésta acarrea; conservando en pequeñas parcelas de cultivo una mezcla de especies y variedades seleccionadas (Zimmerer, 1991a; Brush et al., 1995). Esta forma de manejo de cultivo en mezclas con varios genotipos es común, puesto que es una forma de distribuir el riesgo de fluctuaciones en rendimientos, evitando o reduciendo la diseminación de plagas o enfermedades y es una adecuada estrategia para asegurar la producción de alimentos en caso de ocurrir sequía, heladas, etc. (Brush y Taylor, 1992; Cadima et al., 2003).

El mantenimiento de esta diversidad no es casual ni al azar, se realiza reconociendo cultivares de importancia culinaria (consumo), de adaptación a condiciones locales, demanda del mercado, calidad, viabilidad y características

agronómicas de la semilla (Brush et al., 1981), contribuyendo a diversificar las opciones económicas de la familia campesina, ya que los agricultores no siempre saben cuál será el beneficio futuro o la disponibilidad de variedades específicas. Además esta diversidad tiene una importancia social porque se usan para regalo, rituales, prestigio y hasta en forma de pago. Incluso, las variedades nativas se venden a mejores precios que las variedades mejoradas del mismo cultivo (Brush y Taylor, 1992).

Asimismo, la gran diversidad de papas nativas se hace evidente en el rico ensamblaje de nombres folklóricos que se les da a sus variedades; de acuerdo con sus usos, expresiones sociales, culturales y conocimientos asociados con sus tradiciones (Brush, 1991). Los agricultores mantienen varios cultivares en una diversidad de ambientes (diferentes pisos altitudinales, con microclimas particulares) con la intención de asegurar que la cosecha sea abundante y exitosa, basados en los recursos productivos del suelo, la diversidad de fenotipos y los conocimientos que poseen (Cadima et al., 2003). Una práctica muy importante es el movimiento o flujo de semillas, generados entre y dentro de las comunidades por costumbres y tradiciones sociales, con el propósito de revitalizar o cambiar sus semillas por otros cultivares anteriormente afectados por la presión de las incidencias de plagas y enfermedades, y por efectos acumulativos que ocasionan su degeneración (Terrazas et al., 2003).

Se debe reconocer y agradecer que la conservación de la riqueza clonal de las papas en el Perú es el resultado de la dedicación y esmero de la población autóctona; es decir, los campesinos conservacionistas, que se convierten en los depositarios de las técnicas y métodos ancestrales, y son quienes se empeñan en mantener la mayoría de variedades y formas de papa conocidas (Vargas, 1949), cultivándose hoy en día especies y clones que son los mismos que se cultivan desde hace centenares de años.

3.5 EL PARQUE DE LA PAPA

El apoyo a comunidades campesinas representativas que conservan áreas o zonas agroecológicas con una alta variabilidad de cultivos autóctonos; es una actividad de vital importancia porque permitiría proteger sus cultivos y su cultura asociada (Tapia, 1993). Asimismo con el desarrollo de éstas zonas, en

los microcentros de diversidad genética de cultivares de papa, se incentiva el mantenimiento, la conservación y la difusión de las papas nativas (Otazú, 2000). Éstos centros pueden ser usados como una fuente de germoplasma de tubérculos andinos para restituir los cultivares perdidos por los agricultores (Huamán y Gómez, 2001a).

Con estos fines, la organización no gubernamental ANDES y la ACPDP (Asociación de Comunidades del Parque de la Papa) promovieron la formación del Parque de la Papa (PdP), una iniciativa de creación de un “Área Comunal Conservada”, un modelo único en su género sobre protección del conocimiento tradicional, de los cuales uno de los componentes más importantes está referido a la biodiversidad. Las finalidades primordiales de esta iniciativa son la búsqueda de mecanismos de protección para mantener el carácter agrícola del entorno, reducir la pobreza y asegurar la continuación histórica de la cultura, derechos y conocimientos indígenas hacia los recursos naturales (IIED & ANDES, 2005).

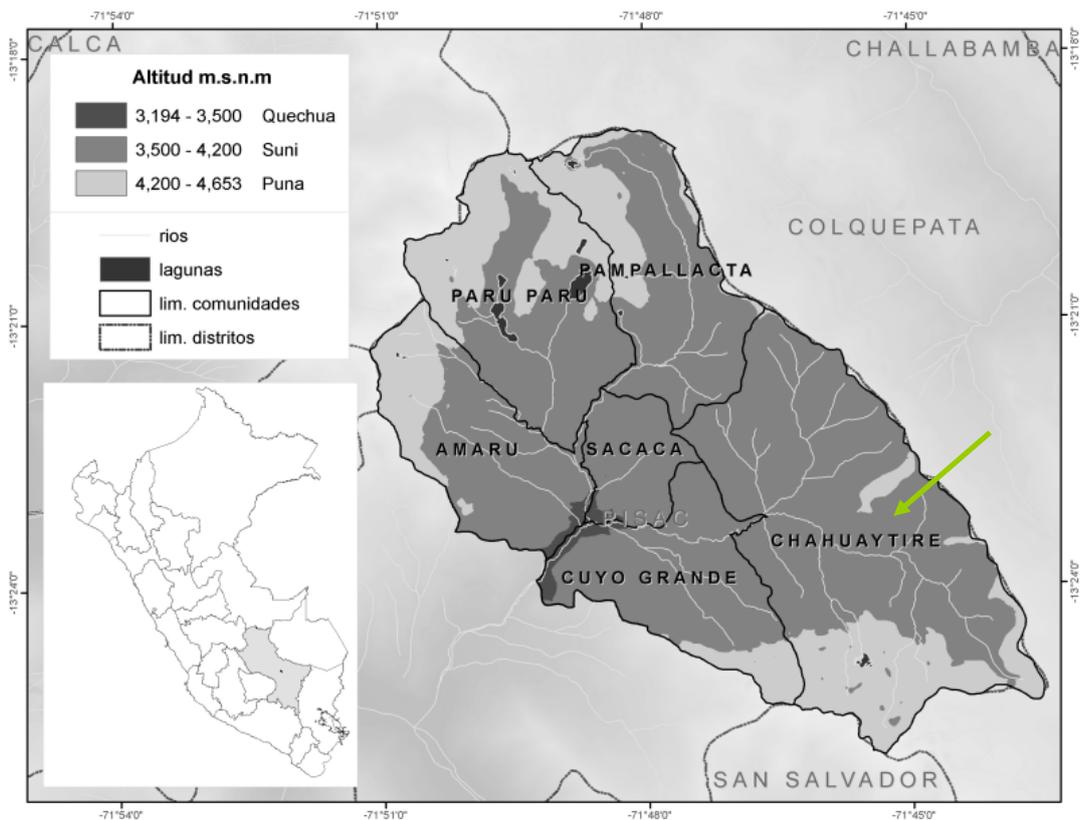


Figura 2. Mapa de las comunidades del “Parque de la Papa”, la flecha indica la ubicación de Chahuaytire.

Esta área de agrobiodiversidad está ubicada en el distrito de Písaq, provincia de Calca, departamento del Cusco en la sierra sur del Perú; una región considerada centro de domesticación, cultivo y evolución de diversas especies nativas andinas (Zimmerer, 1992) y microcentro de diversidad genética de cultivares de papa. El PdP está constituido por seis comunidades campesinas: Chahuaytire, Cuyo Grande, Amaru, Pampallacta, Sacaca y Paru Paru, (*Figura 2*), ubicadas entre los 3 600 a 4 600 msnm., con una superficie de 8 661,19 has (ANDES y ACPDP, 2003); y donde muchos agricultores siembran parcelas con mezclas de cultivares tradicionales de papa. La comunidad campesina de Chahuaytire alberga aproximadamente 100 familias, con cerca de 520 habitantes, la mayoría quechua-hablantes, y las ocupaciones principales, en más del 50%, son las relacionadas a las labores agrícolas (*Tabla 1*). Los habitantes de esta comunidad conservan una de las principales colecciones *in situ* de papa nativa del Parque de la Papa.

Tabla1. Características Socio-Demográficas y de Vivienda de Chahuaytire.

1. Hogar y Vivienda	
Número de viviendas	110
Número de hogares	97
2. Población	
	519
Hombres	257
Mujeres	262
3. Educativas	
Población analfabeta	48.0%
4. Laborales	
Población Económicamente Activa (PEA)	
	158
Ocupación principal	
Agricultores y trabajadores agrícolas calificados	51.00%
Obreros de manufacturas, minas, construcción y otros	9.93%
Vendedores ambulantes	33.77%
Otros	5.30%

Fuente: INEI (1993). IX Censo de Población y IV Vivienda.

Recientemente, el Centro Internacional de la Papa suscribió un convenio de cooperación técnico-científico con la Asociación de Comunidades del “Parque de la Papa” con el propósito de impulsar el cultivo, uso y mantenimiento de una gran variedad de papas nativas y garantizar que los conocimientos y tecnologías ancestrales vinculadas con su cultivo permanezcan bajo la custodia de las comunidades y no sean objeto de manejos inapropiados de los derechos de propiedad intelectual (ANDES, CIP y ACPDP, 2005).

3.6 REPATRIACIÓN DE PAPAS NATIVAS

Las actividades de Repatriación de germoplasma nativo son consideradas de importancia y obligatorias para aquellas instituciones que manejan colecciones de germoplasma *ex situ*, y se complementan con la restauración del recurso nativo, por lo que son reintroducidos en los lugares en los que fueron originalmente colectados y en donde éstos recursos han estado disminuyendo por el manejo inadecuado de los agricultores en sus campos de cultivo (Ortíz & Engels, 2004).

En el marco del convenio CIP-ACPDP se pretende retornar o reintroducir a las comunidades, materiales clonales libres de virus mantenidos *ex situ* en la colección del Banco de Germoplasma del CIP, denominadas **papas nativas repatriadas** (Gómez y Roca, 2001), colectadas en el departamento del Cusco en la década de los 60 por el CIP (IIED & ANDES, 2005). A ésta iniciativa se le ha denominado Repatriación de Papas Nativas, cuyo fin principal es la restauración y distribución de vuelta (de retorno) a los agricultores, de la biodiversidad local afectada por enfermedades y/o epidemias de los cultivos, migraciones forzadas y pobreza; impulsando la diversificación de los cultivos y aumentando la productividad de los mismos. La Repatriación de Papas Nativas realizada por el CIP se está llevando a cabo desde el año 1998 (Huamán y Gómez, 2001b) en diversas comunidades campesinas de Ayacucho, Cajamarca, Cusco, Lima, Huánuco, Huancavelica y Junín. En Octubre del 2002 fueron repatriados o reintroducidos 246 cultivares nativos de papa a las comunidades del Parque de la Papa. Mediante estas iniciativas de conservación *in situ* es posible promover y fomentar el rescate de cultivos de la posible pérdida de cultivares, y a la vez sirven como un sistema dinámico de mantenimiento de la variabilidad genética (Sánchez & Cosío, 2000), actuando como un reservorio natural de genes bajo constante presión de selección.

La repatriación de variedades de papa hacia el Parque de la Papa es una manera de proteger, restaurar y ampliar los recursos naturales de este microcentro de diversidad genética, siendo el artículo 17.2 del Convenio sobre Diversidad Biológica, referido a la repatriación o el retorno de variedades hacia sus lugares de origen, el mandato que reconoce los derechos de los agricultores tradicionales sobre el conocimiento y uso adecuado de las variedades repatriadas de papa (IIED y ANDES, 2005).

3.7 MARCADORES MOLECULARES

La diversidad de una especie está constituida por todas las variaciones genéticas producto de las diferencias entre las especies y la variabilidad genética se explica por las diferencias dentro de cada especie. La cantidad y distribución de la diversidad genética dentro y entre poblaciones esta dada por la variación en loci específicos de marcadores genéticos entre muestras e individuos es expresada como polimorfismo (de Vicente, 2004; Sevilla y Holle, 2004).

Los rápidos avances en biología molecular, principalmente el desarrollo de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) han dado origen a técnicas muy versátiles que son usadas para analizar el polimorfismo a nivel de ADN (Ferreira y Grattapaglia, 1998). De esta forma, los marcadores moleculares se constituyen en eficaces herramientas para estudiar y validar la taxonomía (identificación y clasificación) de las especies; la variabilidad dentro y entre especies; las distancias genéticas; validez de agrupaciones e identificaciones individuales y sirven como mecanismos o elementos de diagnóstico particular de cada especie (Ayad et al., 1997).

La huella digital o “fingerprinting” del ADN es un intento por descubrir marcadores moleculares particulares de cada especie basados en las diferencias existentes en los ácidos nucleicos. El uso de esta metodología permiten diferenciar cultivos de importancia económica, como la papa, que tienen grandes semejanzas morfológicas y que quizás sean derivados de sus progenitores únicamente por mutaciones somáticas. Así, diversos ensayos lograron diferenciar cultivares de papa usando iniciadores RAPD (ADN Polimórfico Amplificado al Azar), sondas RFLP (Polimorfismo de Longitud de los Fragmentos de Restricción) e iniciadores SSR, distinguiéndolos así de otros individuos del mismo cultivar (Spooner y Lara, 2000).

3.8 MICROSATÉLITES

Los microsatélites son secuencias simples repetidas (SSRs) de 1 a 6 nucleótidos dispuestas en tándem y dispersos en el genoma, en regiones codificantes y no codificantes (Zane et al., 2002), presentes en organismos eucarióticos (Tautz & Renz, 1984) como procarióticos (Van Belkum et al., 1998; Gur-Arie et al., 2000). Los microsatélites exhiben un polimorfismo basado en unas repeticiones en tándem (8 hasta 100 repeticiones) que permiten la variación en el tamaño de la región microsatélite amplificada en individuos de una misma especie (Ellegren, 2000). Los microsatélites más polimórficos en plantas tienen en su mayoría secuencias dinucleotídicas (AT) y amplias tasas de mutación, en el orden de 10^{-2} a 10^{-6} por gameto (Provan et al., 1996; Ashkenazi et al., 2001; Lai & Sun, 2003).

Los marcadores SSR son usados como un efectivo método de tipificación genética gracias a su abundancia y distribución en el genoma, herencia codominante, elevada tasa de mutación, sumados a su alta reproducibilidad en comparación con otros marcadores moleculares, su fácil detección, por requerir procedimientos técnicos simples repetibles y su potencial para la automatización; (Jones et al., 1997; Weising et al. 1994; Holton, 2001). Sus aplicaciones abarcan estudios de ADN ancestral y forense, genética de poblaciones y también de conservación y manejo de recursos biológicos (Jarne & Lagoda, 1996), como es el caso de identificación de individuos, análisis de identidad genética, estudios de diversidad y estructura genética, ubicación de genes o complejos de genes deseables y la ubicación física de una secuencia de ADN de interés en el mapa cromosómico de una accesión determinada con fines de mejoramiento (Karp & Edwards, 1995; Powell et al., 1996; Weising et al., 1998; Gupta & Varshney, 2000).

El método más empleado para analizar las variaciones de los microsatélites en el número de repeticiones, es usando la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), sintetizando iniciadores específicos y complementarios a la región flanqueante o contigua a las regiones del microsatélite. Los microsatélites son amplificados y se visualizan como fragmentos de ADN de diferente longitud. Cada una de las regiones microsatélites constituyen un locus genético y los diferentes tamaños de los fragmentos de ADN obtenidos luego de la amplificación constituyen los

diferentes alelos de un locus (Ferreira y Grattapaglia, 1998). Un individuo homocigoto para un locus tendrá el mismo número de repeticiones o copias en un cromosoma homólogo, mientras que un individuo heterocigótico tendrá diferente número de repeticiones o diferentes alelos en un locus (Schlötterer & Tautz, 1992).

En algunos loci SSR ocurre un aumento/disminución del número de repeticiones debido al “deslizamiento” de la enzima *Taq* polimerasa en el proceso de replicación *in vitro* del ADN (Shinde et al., 2003), este fenómeno da como resultado las llamadas “stutter bands” (bandas tartamudas) y son más frecuentes en secuencias dinucleotídicas y menos frecuentes en secuencias trinucleotídicas (Ashkenazi et al., 2001).

En otros casos se observan dos zonas o regiones amplificadas en el gel de poliacrilamida usando el mismo par de iniciadores, éstos son conocidos también como iniciadores multiloci. Estas zonas amplificadas pueden ser duplicaciones de un mismo locus microsatélite o regiones diferentes posiblemente debido al mal diseño de iniciadores (Jarne & Lagoda, 1996; Villamón, 2000).

3.9 ESTUDIOS PREVIOS DE CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE PAPAS CULTIVADAS

Con fines de establecer una muestra representativa (o colección núcleo) de la colección de papas cultivadas en el CIP, Ghislain et al., (1999) y Huamán et al., (2000) realizaron los primeros análisis de tipificación genética trabajando en la colección completa de *Solanum phureja* usando la técnica de ADN Polimórfico Amplificado al Azar (RAPD), el primero; y el segundo, con la colección completa de *Solanum tuberosum* subsp. *andigenum* utilizando isoenzimas. Debido a las desventajas técnicas que presentan tanto los marcadores RAPDs (baja reproducibilidad de las bandas amplificadas y limitado número de locus observables) como las isoenzimas (representan sólo una pequeña porción del genoma y son dependientes del estadio específico y órgano de la planta) (CIAT, 1991), el uso de éstas técnicas fue limitándose hasta ser reemplazadas por otras como los microsatélites, que presentaban

niveles de heterocigocidad más elevados en papas cultivadas (Isenegger et al., 2001; Coombs et al., 2004).

El primer reporte de SSRs en papa se basó en secuencias de ADN de bases de datos, de los cuales cinco de esos marcadores fueron empleados para caracterizar anteras derivadas de papas (Veilleux et al., 1995). Estudios de relaciones genéticas en *Solanum tuberosum* L. fueron realizados por Provan et al., (1996) y Schneider & Douches en 1997, demostrando una identificación adecuada de los cultivares. Más adelante Milbourne et al., (1998) realizaron un 'screening' o exploración, a partir de librerías genómicas enriquecidas, de motivos repetidos dentro de regiones con secuencias de expresión específicas (ESTs, expressed sequences tagged, por sus siglas en inglés), revelando que un 5% de estas regiones contenían microsatélites. Schneider & Douches (1997), basándose en los iniciadores SSR desarrollados por Veilleux et al., (1995), identificaron polimorfismos en cultivares norteamericanos de *Solanum tuberosum* subsp. *tuberosum*. A su vez Coombs et al., (2004), basándose en estudios previos de Provan et al., (1996); Milbourne et al., (1998) y Ghislain et al., (2000) lograron identificar y caracterizar con éxito un grupo de cultivares de papa de Norteamérica de importancia comercial.

Por otro lado en el CIP, Villamón, (2000) caracterizó 36 variedades cultivadas de *Solanum* sec. *Petota* con 13 iniciadores SSR demostrando que las regiones que flanquean a los microsatélites se conservan entre las especies de papa cultivada. De un total de 70 marcadores SSRs, Ghislain et al., (2000) seleccionaron 18 microsatélites y luego de los ensayos respectivos, se ubicaron en las siete especies de papa cultivada. Esta información fue usada más adelante para sustentar la aplicabilidad de estos marcadores SSRs en varios grupos de cultivares de papa, con el objetivo de generar un "kit" de identificación genética, con fines de mejorar el manejo en los bancos de germoplasma, uso en mapeo genético, conservación y manejo de la colección del CIP, y en particular para estudiar el "pool" génico de las papas nativas de los Andes (Ghislain et al., 2004).

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 MATERIALES

4.1.1 MATERIAL BIOLÓGICO

4.1.1.1 MATERIAL VEGETAL

Hojas jóvenes y tubérculos de 195 papas nativas colectadas de la comunidad de Chahuaytire y de 246 papas nativas repatriadas por el CIP al Parque de la Papa, que incluyen las siguientes especies: STN, GON, CHA, JUZ, ADG y CUR, mantenidas por los agricultores conservacionistas (ANEXOS 1 y 2). Si bien se tienen datos de especies en las papas repatriadas por el CIP, no será usada esta información en los análisis de los resultados debido a que aún está en proceso la identificación de especies de las papas nativas de Chahuaytire.

4.1.1.2 ADN Y ENZIMAS

- i. Fago λ
- ii. Plásmido pUC 18
- iii. Enzima *Taq* ADN polimerasa
- iv. Enzima ribonucleasa A
- v. Endonucleasa de restricción *Pst* I

4.1.1.3 INICIADORES

Se evaluaron 10 loci microsatélites distribuidos en nueve de los doce cromosomas de la papa (Tabla 2). Los 9 pares de iniciadores microsatélites fueron escogidos del kit de identificación de especies de papa desarrollados por el CIP con los más altos niveles de polimorfismo, según el Contenido de Índice Polimórfico (PIC) (Ghislain et al., 2000; Ghislain et al., 2004).

Tabla 2. Información de los 10 loci e iniciadores microsatélites evaluados en el presente estudio.

Código de los loci SSR	Código de laboratorio	Motivo de la repetición	Secuencia del Iniciador (5'-3')	Tipo	Grupo de ligamiento	Tamaños reportados (pb)	T° a
STM0019a	S011a	(AT) ₇ (GT) ₁₀ (AT) ₄	AATAGGTGACTGACTCTCAATG	Intergénico	VI	155-241	47
STM0019b	S011b	(GT) ₅ (GC) ₄ (GT) ₄	TTGAAGTAAAGTCCTAGTATGTG		n.d.	83-124	
STPoAc58	S029	(TA) ₁₃	TTGATGAAAGGAATGCAGCTTGTG ACGTTAAAGAAGTGAGAGTACGAC	3' UTR	V	231-277	57
STM0037	S042	(TC) ₅ (AC) ₆ AA (AC) ₇ (AT) ₄	AATTTAACTTAGAAGATTAGTCTC ATTTGGTTGGGTATGATA	Intergénico	XI	73-125	Td 55-60
STM0030	S047	Compuesto (GT/GC) (GT) ₈	AGAGATCGATGTAAAAACACGT GTGGCATTGATGGATT	Intergénico	XII	122-191	53
STM1104	S081	(TCT) ₅	TGATTCTCTTGCCTACTGTAATCG CAAAGTGGGTGAAGCTGTGA	3' UTR	VIII	164-185	57
STM1052	S084	(AT) ₁₄ GT(AT) ₄ (GT) ₆	CAATTCGTTTTTTCATGTGACAC ATGGCGTAATTTGATTTAATACGTAA	Intrón	IX	212-268	Td 50-60
STM1106	S101	(ATT) ₁₃	TCCAGCTGATTGGTTAGGTTG ATGCGAATCTACTCGTCATGG	Intrón	X	142-196	55
STM2013	S104	(TCTA) ₆	TTCGGAATTACCCTCTGCC AAAAAAGAACGCGCACG	Intergénico	VII	146-172	55
STM2022	S106	(CAA) ₃ ...(CAA) ₃	GCGTCAGCGATTTTCAGTACTA TTCAGTCAACTCCTGTTGCC	Intergénico	II	184-241	53

4.1.1 IMPLEMENTOS DE LABORATORIO

4.1.1.1 MATERIALES

Cajas de dilución x 96 (Beckman)	Placas x 96 -PCR (MJ Research)
Espátulas, pinzas y tijeras	Probetas (Pyrex)
Micropipetas (Eppendorf y Gibco)	Puntas de 10, 200, 1000 µl (Fisher, Sigma)
Papel TR-DO18 (Typon-Promega)	Tubos cónicos de 50 ml (Corning)
Papel Tissue (Kinwipe)	Tubos de 0.6 y 1.7 ml (Eppendorf)
Pilones y morteros (Corn)	Vasos de precipitación (Pirex)

4.1.1.2 EQUIPOS

Agitador magnético (Fisher Scientific)	Fuentes de poder (Life Technologies)
Balanza analítica modelo GA110 (Ohaus)	Liofilizador (Speed Vac Plus)
Baño María (Precision Scientific)	Máquina de hielo (Scotsman)
Cámara de electroforesis horizontal modelo H4 (Life Technologies)	Microcentrífuga modelo 5415C (Eppendorf)
Cámara de electroforesis vertical S2 (Gibco)	Potenciómetro modelo 240 (Corning)
Captador de imágenes digital Sistema Eagle Eye II (Stratagene)	Purificador de agua modelo MilliQ plus (Millipore)
Computadora compatible Pentium IV	Scanner Snap 1200s (AGFA)
Congeladora de -70 °C (Forma Scientific)	Termociclador PTC 100 (MJ Research)
Destilador de agua (Wheaton Instruments)	

4.1.1.3 MATERIAL QUÍMICO

Ácido acético glacial (Merck)	Colorante Dye (Sigma)
Ácido bórico (Fisher Scientific)	Desoxinucleótidos dATP, dGTP, dCTP, dTTP (Life Technologies)
Ácido clorhídrico (Merck)	Etanol absoluto (Merck)
Ácido etilen-diamina-tetra-acético (Sigma)	Formaldehído (Fisher Scientific)
Acrilamida (Fisher Scientific)	Formamida (Sigma)
Agarosa ultra pura (Gibco)	Hidróxido de sodio (Merck)
Agua libre de nucleasas (Sigma)	Iniciadores de PCR (GenSet y Gibco)
Agua purificada milli-Q	Isopropanol (Merck)
Alcohol isoamílico (Sigma)	Mercaptoetanol (Sigma)
Alcohol rectificado al 96%	N,N,N',N' tetra metil etilen diamina
Azul de bromofenol (Sigma)	Nitrato de plata (Quimica Service)
Bind metacriloxipropil-trimetoxi-silano (Pharmacia Biotech)	Nitrógeno líquido
Bis-acrilamida (Sigma)	Persulfato de amonio (Sigma)
Bromuro de etidio (Sigma)	Solución fijadora GBX 5X (Kodak)
Carbonato de sodio (Merck)	Solución reveladora GBX 5X (Kodak)
Cloroformo (Merck)	Tiosulfato de sodio (Fisher Scientific)
Cloruro de magnesio (Merck)	Tris [hidroxi metil]-amino-etano (Sigma)
Cloruro de sodio (Merck)	Urea (Sigma)
Colorante Azul de Bromofenol (Sigma)	Xilene cianol (Sigma)

4.2 MÉTODOS

4.2.1 ENSAYO EXPERIMENTAL

En el ANEXO 7 se describe la preparación de los reactivos para el procedimiento experimental.

4.2.1.1 TOMA DE MUESTRAS PARA EXTRACCIÓN DE ADN

Este procedimiento intentó cubrir toda la variabilidad presente en los cultivares nativos de papa (*Solanum* sec. *Petota*) de la comunidad de Chahuaytire, utilizando información sobre los caracteres morfológicos de 195 tubérculos, con la participación activa de los “Papa Arariwas” (agricultores conservacionistas) y la estrecha colaboración del Ing. René Gómez, científico de la División de Conservación y Caracterización de los Recursos Genéticos del CIP. Las 246 papas nativas repatriadas por el Banco de Germoplasma del CIP se sembraron en las comunidades de Chahuaytire y Pampallacta en el 2002. La toma de muestras de hojas para ambos grupos se realizó en Febrero del 2003 y la de tubérculos en Agosto del mismo año. Las papas nativas repatriadas se evaluaron conjuntamente con el Br. Geoffrey Gonzáles de la Universidad Nacional de Trujillo en los Laboratorios de Biotecnología Aplicada del CIP.

4.2.1.2 AISLAMIENTO DE ADN GENÓMICO

Para la extracción del ADN se usó el método del CTAB modificado (CIP, 1997).

4.2.1.3 CUANTIFICACIÓN DEL ADN

Las muestras de ADN extraído se visualizaron en geles de agarosa al 1% (p/v) mediante tinción con bromuro de etidio; el grosor y la intensidad de la banda observada en el gel se compararon con el primer fragmento de la digestión del ADN del fago λ digerido con *Pst* I, que es equivalente a 280 ng/ μ l, estimándose la concentración y calidad del ADN de cada cultivar por comparación visual. Las muestras luego se diluyeron con agua libre de nucleasas hasta alcanzar una concentración de 1ng/ μ l.

4.2.1.4 AMPLIFICACIÓN DE LOS MICROSATÉLITES

Las muestras de ADN de las papas nativas se amplificaron en un volumen final de 20 μ l usando 10 ng de ADN, tampón para PCR 1X (100 mM de Tris-HCl, 20 mM de sulfato de amonio y 2,5 mM de $MgCl_2$); 0.2 mM de cada dNTP; 0,5 μ M de cada iniciador (directo y reverso) y aproximadamente 1U de enzima *Taq* polimerasa producida en el CIP. Se siguieron los programas de amplificación estandarizados en el CIP (CIP, 1997), de acuerdo a la temperatura óptima de unión de cada iniciador a la región flanqueante del microsatélite (*Tabla 2*). Antes de realizar la electroforesis en geles de poliacrilamida al 6%, los productos de amplificación fueron visualizados en geles de agarosa al 3%, con la intención de verificar que las diluciones y amplificaciones en las muestras de ADN se hayan realizado adecuadamente.

4.2.1.5 DETECCIÓN DE LOS SEGMENTOS MICROSATÉLITES AMPLIFICADOS

Los fragmentos amplificados se separaron mediante electroforesis en geles denaturantes de poliacrilamida al 6%, siendo el tiempo de corrida dependiente del tamaño de los fragmentos, tomando como referencia de corrida al colorante de carga xilen cianol (azul claro), el cual tiene un peso equivalente a 106 pb (CIP, 1997). Los fragmentos amplificados se visualizaron mediante tinción del gel de poliacrilamida con nitrato de plata.

4.2.1.6 REGISTRO DE ALELOS

El tamaño de los fragmentos (alelos) fue estimado utilizando como marcador de tamaño de banda a parte de la reacción de secuenciamiento del plásmido pUC 18 (ANEXOS 3 y 4). Para el registro de los bandas SSR o alelos en el gel de poliacrilamida se tomó en cuenta la banda superior de cada par de bandas que conforman un alelo; si es que ambas bandas son visibles, o la más intensa de un par de bandas en el caso de bandas tartamudas (Ghislain et al., 2004). Solamente aquellas bandas que mostraron patrones SSR definidos fueron usadas en este análisis, realizando hasta tres repeticiones en el caso de dificultades en el registro de bandas SSR dudosas.

Los patrones de alelos obtenidos se registraron mediante una matriz binaria usando el software Excel 2000 de Microsoft, en la cual a los alelos SSR presentes se les asigna el valor de 1 y a los alelos SSR ausentes el valor de 0 (ANEXO 5).

4.2.2 ANÁLISIS DE DATOS

4.2.2.1 RIQUEZA ALÉLICA Y ALELOS PRIVADOS

El número de alelos o riqueza alélica es una medida fundamental de variación genética y un estadístico usado para identificar poblaciones para conservación (Kalinowski, 2004). Esta medida intenta retener la información alélica total indicando la variación genética que existe en las poblaciones y se refiere al número total de alelos distintos observados en cada locus simple por población o grupo evaluado (Frankel et al., 1995).

El número de alelos únicos en una población son conocidos como alelos exclusivos o privados (“private alleles”), ésta es una medida simple de diferenciación poblacional (Kalinowski, 2004).

4.2.2.2 ÍNDICE DE DIVERSIDAD GENÉTICA (ID)

Esta medida de variación genética se calculó usando la estadística desarrollada por Nei (1973), llamada índice de diversidad genética o heterocigosidad esperada. Los valores de diversidad basados en las frecuencias alélicas fueron calculados para cada locus microsatélite. Su interpretación biológica es la probabilidad de que dos gametos escogidos al azar de la muestra o población sean diferentes en un locus (Frankel et al., 1995).

$$ID = 1 - \sum (p_i)^2$$

Donde p_i es la frecuencia del i^{mo} alelo detectado en un locus.

4.2.2.3 ANÁLISIS DE AGRUPAMIENTO

Los datos de la matriz binaria se procesaron usando el programa **NTSYS-pc** (Sistema de Análisis Multivariado de Taxonomía Numérica) versión 2.1 (Rohlf, 2000). Éste es un paquete informático de algoritmos

para producir análisis fenéticos a partir de datos genéticos (frecuencia de genes), datos cuantitativos y datos cualitativos (presencia y ausencia), calculando la afinidad entre unidades taxonómicas basados en el estado de sus caracteres (Spooner, 2003).

En la aplicación de las técnicas de Taxonomía Numérica cada individuo (en este caso cada cultivar de papa nativa) será considerado como una UTO (Unidad Taxonómica Operativa). Para cada cultivar se definen los estados de los caracteres a comparar, por ejemplo entre dos UTOs j y k, se toman en cuenta caracteres dobles de presencia y ausencia de un locus o alelo SSR, existiendo cuatro posibilidades:

- a. Que ambos UTOs compartan el locus SSR a evaluar (1,1)
- b. Que ambos UTOs no compartan el locus SSR a evaluar (0,0)
- c. Que el primero de ellos presente el locus SSR y esté ausente en el otro (1,0)
- d. Que el segundo de ellos presente el locus SSR y esté ausente en el primero (0,1)

La representación en una matriz binaria sería la siguiente:

		UTO j	
		1	0
UTO k	1	1,1 a	1,0 b
	0	0,1 c	0,0 d

Los datos SSR obtenidos de los estados de presencias y ausencias de cada locus SSR registrados en una matriz binaria fueron comparados con el Coeficiente de Asociación de Jaccard (CAJ) para medir o calcular la similitud genética:

CAJ = $a/(a+b+c)$

Donde “a” es el número de alelos SSR comunes entre dos individuos, “b” es el número de alelos únicos en el individuo uno y “c” es el número de alelos únicos en el individuo dos. En la utilización del Coeficiente de Asociación de Jaccard no se considera a d (0,0) como un elemento favorable de similitud. Con este coeficiente se generaron

matrices de similitud genética, que luego se usaron para el análisis de agrupamiento por el método UPGMA (Algoritmo de Agrupamiento de Medias no Ponderadas) que permite obtener gráficas de semejanza genética (CIP, 2002).

Para comprobar la eficiencia del método de agrupamiento empleado, se realizó una prueba de bondad de ajuste para cuantificar el grado de distorsión en el árbol obtenido, empleando el Análisis Cofenético (Sneath & Sokal, 1973), calculado mediante un coeficiente de correlación (r) producido entre los datos de la matriz de similitud original (Jaccard) y una nueva matriz cofenética obtenida a partir de los datos del agrupamiento.

Para determinar el nivel de confianza de las ramas del fenograma, se realiza el análisis Bootstrap; una técnica computarizada para evaluar la eficacia de estimadores estadísticos. Los datos del Bootstrap se generan por la selección aleatoria o al azar con reemplazo de los marcadores polimórficos de la matriz (Yap & Nelson, 1986). El proceso es independiente y se puede repetir bajo un número de repeticiones previamente fijados, en el que se adjuntan valores numéricos a las ramas internas del fenograma como una manera de soporte en la correspondencia de los grupos formados (Hillis et al., 2005). Se evalúan las proporciones de concordancia de la topología óptima con el árbol original, expresándose en porcentaje (Efron et al., 1996). Los límites de confiabilidad en la formación del fenograma generado son valores que se asumen correctos cuando son iguales o mayores a 70% con un nivel de certeza del 95% (Hillis & Bull, 1993).

4.2.2.4 ANÁLISIS DE VARIANZA MOLECULAR

Para evaluar la diferenciación genética de ambos grupos, se utilizó el método conocido como 'Análisis de la Varianza Molecular' (AMOVA) (Excoffier et al., 1992) incorporado en el programa Arlequín ver 2.0 (Schneider et al., 2000).

El estudio de la variación molecular, es derivado de una matriz de distancias al cuadrado entre todos los pares de haplotipos; cada haplotipo es definido como la constitución alélica particular que se obtiene al evaluar los loci microsatélite de cada individuo. AMOVA

produce estimaciones de componentes de variancia y análogos a los F-estadísticos, designados como ϕ -estadísticos, y refleja la correlación de la diversidad haplotípica en diferentes niveles de subdivisión jerárquica (Excoffier et al., 1992).

El análisis de la varianza dentro y entre las poblaciones se basa en el hecho de que una suma de cuadrados convencional (SC) puede escribirse como la suma de las diferencias al cuadrado entre todos los pares de observaciones realizadas, siendo posible construir un análisis jerárquico de la varianza (molecular) directamente a partir de las diferencias al cuadrado entre todos los pares de haplotipos (Excoffier et al., 1992).

Los componentes de la variancia y ϕ -estadísticos se prueban usando una técnica permutacional, eliminando la presunción de normalidad que es convencional para este tipo de análisis de variancia pero inapropiado para datos moleculares.

Los valores de los ϕ_{ST} se analizan de modo semejante a los de F_{st} y sus rangos respecto a la diferenciación genética son:

- de 0 a 0.05 poca diferenciación
- de 0.05 a 0.15 moderada diferenciación
- de 0.15 a 0.25 gran diferenciación
- mayor de 0.25 diferenciación genética muy grande

5. RESULTADOS

5.1 POLIMORFISMO DE LOS LOCI MICROSATÉLITES EN PAPAS NATIVAS DE CHAHUAYTIRE Y CIP REPATRIADAS

Los 9 iniciadores usados amplificaron en todas las muestras y produjeron alelos o fragmentos microsatélites con un tamaño mínimo de 75 pb (STM0037) y un máximo de 268 pb (STPoAc58) en los 441 cultivares de papa nativa de ambos grupos (*Tabla 3*).

Tabla 3. Rango de fragmentos microsatélites amplificados en papas nativas de Chahuaytire y CIP repatriadas.

Loci SSR	Código de laboratorio	Motivo Repetido	Tipo de Microsatélite	Tamaño obtenido (pb)
STM0019a	S011a	(AT) ₇ (GT) ₁₀ (AT) ₄	Compuesto	146-236
STM0019b	S011b	(GT) ₅ (GC) ₄ (GT) ₄		92-123
STPoAc58	S029	(TA) ₁₃	Puro	231-268
STM0037	S042	(TC) ₅ (AC) ₆ AA (AC) ₇ (AT) ₄	Interrumpido compuesto	75-123
STM0030	S047	(GT/GC) (GT) ₈	Compuesto	130-168
STM1104	S081	(TCT) ₅	Puro	164-182
STM1052	S084	(AT) ₁₄ GT(AT) ₄ (GT) ₆	Interrumpido compuesto	201-268
STM1106	S101	(ATT) ₁₃	Puro	130-196
STM2013	S104	(TCTA) ₆	Puro	147-213
STM2022	S106	(CAA) ₃ ...(CAA) ₃	Puro	185-243

De la evaluación entre el rango obtenido en el tamaño de alelos y el tipo de SSR (de acuerdo a la clasificación de Jarne & Lagoda, 1996) se determinó que los loci STM0019a y el STM1052 presentaron el rango más amplio (con una diferencia de 90 pb y 67 pb respectivamente) y corresponden a los tipos de SSR compuesto e interrumpido compuesto, respectivamente; siendo a su vez los que presentaron los índices de diversidad más elevados. Los loci con menor rango en el tamaño de alelos fueron el STM1104 y el STM0019b (con una diferencia de 18 pb y 31 pb, respectivamente).

El locus STM0019 resultó multiloci, presentando dos zonas o regiones conocidas como STM0019a y STM0019b (*ver Figura 7*), siendo más variable la zona de mayor peso molecular (zona a). Además, se detectaron 'bandas tartamudas' en el locus STM1052 que dificultaron la toma de datos (*Figura 12*). El fenotipo molecular de los 9 iniciadores SSR evaluados se observan en el ANEXO 6 (*ver Figuras 7-15*).

5.2 RIQUEZA ALÉLICA Y ALELOS EXCLUSIVOS DE PAPAS NATIVAS DE CHAHUAYTIRE Y CIP REPATRIADAS

Se encontraron 114 alelos en las papas nativas de Chahuaytire y 130 alelos en las papas nativas repatriadas por el CIP y gran parte de estos alelos fueron compartidos por ambos grupos. El locus SSR con mayor número de alelos fue el STM0019a con 19 alelos para Chahuaytire y 21 alelos reportados para las papas repatriadas por el CIP. El locus con menor número de alelos correspondió al STM2022, con sólo 5 alelos para ambos grupos (*Tabla 4*). Los patrones o fenotipos moleculares de los 10 loci SSR evaluados para el presente estudio se observan en el ANEXO 6. El reporte de los tamaños de todos los alelos encontrados, determinados mediante la comparación con los tamaños de los fragmentos obtenidos del secuenciamiento de parte del plásmido pUC 18, se observan en la *Tabla 4*.

Respecto a los alelos exclusivos, en Chahuaytire se obtuvieron un total de 6, distribuidos en 4 de los 9 loci SSR evaluados y en los cultivares repatriados por el CIP se encontraron 22 alelos exclusivos distribuidos en 8 loci SSR. Por otra parte, en el locus STM2022, todos los alelos encontrados fueron comunes en ambos grupos evaluados (*Tabla 4*). La relación de cultivares de papa nativa de Chahuaytire y de papas repatriadas por el CIP con alelos exclusivos se observan en la *Tabla 5*.

Tabla 4. Caracterización alélica de los loci SSR evaluados en papas nativas de Chahuaytire y CIP repatriadas

Loci SSR	Código	Tamaño de los alelos (pb)																							AC	Chahuaytire		CIP	
		146	158	160	162	166	168	170	176	178	180	182	192	194	196	198	201	203	206	208	211	213	236	RA		EX	RA	EX	
STM0019a	S011a	146	158	160	162	166	168	170	176	178	180	182	192	194	196	198	201	203	206	208	211	213	236	18	19	1	21	3	
STM0019b	S011b	92	94	96	97	98	101	103	105	106	116	117	120	123										11	11	0	13	2	
STPoAc58	S029	231	233	234	235	237	239	240	241	242	244	245	247	252	265	268								12	12	0	15	3	
STM0037	S042	75	77	79	81	83	85	87	92	93	95	96	109	123										9	9	0	13	4	
STM0030	S047	130	136	138	142	144	146	150	152	162	168													8	8	2	19	0	
STM1104	S081	164	167	169	171	172	174	176	177	179	180	182												9	9	0	11	2	
STM1052	S084	201	212	213	221	225	229	230	232	236	240	242	244	249	253	255	257	260	261	263	265	268	16	18	2	19	3		
STM1106	S101	130	142	145	148	152	154	158	160	163	166	169	175	196										10	11	1	12	2	
STM2013	S104	147	149	156	157	158	160	162	163	164	166	173	176	213										10	10	0	13	3	
STM2022	S106	185	187	190	200	243																		5	5	0	5	0	
Total																114	6	130	22										

Interpretación:

- Alelos exclusivos de CIP repatriadas
- Alelos exclusivos de Chahuaytire
- Alelos compartidos por loci SSR
- AC** Número de Alelos Compartidos por ambos grupos
- RA** Riqueza Alélica
- EX** Número de alelos Exclusivos

Tabla 5. Alelos exclusivos en los cultivares de papa nativa de Chahuaytire y CIP repatriadas

Alelos exclusivos	Código de muestra	Nombres nativos	Frecuencia en Chahuaytire
Chahuaytire			
S011a.178	CHA 57, CHA 140	<i>Yuraq Ch'akillo, Puka Ch'akillo</i>	frecuente
S047.146	CHA 9, CHA 57, CHA 140	<i>Waqankillay, Yuraq Ch'akillo, Puka Ch'akillo</i>	frecuente
S047.152	CHA 246	<i>Yana Tarma</i>	raro
S084.232	CHA 47, CHA 49, CHA 107	<i>Sole Wayro, Pariwana?, Pariwana</i>	frecuente
S084.236	CHA 49a	<i>Puka T'omera</i>	frecuente
S101.169	CHA 34	<i>Unchuna</i>	raro
CIP repatriadas			
S011a.146	700790, 703920	<i>Sakalo, Unknown</i>	
S011a.170	704697, 704102, 703919, 700832	<i>Koleto, Carrion, Q'ala Warmi, Moro Taclla</i>	
S011a.192	703946, 704587	<i>Puka Araq, Puka Pole Araq,</i>	
S011b.116	702078, 706334, 706622, 703928, 702205, 700219	<i>Yuracc Kaipi, K'apu, Moro Ccusi, Yuraq Lomo, Uchucutana, Alcca Imilla</i>	
S011b.117	704560, 703919	<i>Makuku, Q'ala Warmi</i>	
S029.244	701076, 702407, 703933, 703996, 706025, 703983, 703985, 704601	<i>Muru Warmi, Yana Lenle, Titerite, Cheqchi Quisu, Puka Runtush o Cibra, Wallapi Toro, Runtu, Yana Choqllus</i>	
S029.252	703919	<i>Q'ala Warmi</i>	
S029.268	704504	<i>Puka Huato</i>	
S042.81	703946, 700754, 704587, 704028	<i>Puka Araq, Manzanilla, Puka Pole Araq, Sanki Wayta</i>	
S042.83	702333, 706119, 705601, 703137, 705611, 700135, 703932, 701535, 702132	<i>Chiquina, Misquilla, Yana Palta, Peshgo Papa, Unknown, Alq'a Imilla, Muru T'alaku, Caramarca, Yuracc Paltana</i>	
S042.96	704560, 704562	<i>Makuku, Urpiña</i>	
S042.109	703933	<i>Titerite</i>	
S081.167	703445, 704413, 704604, 704617, 704560, 700988	<i>Uchu Q'aspa, Chusu Papa, Azul Khawina, Chiar Sani, Makuku, Sale Ccompis</i>	
S081.171	706622	<i>Moro Ccusi</i>	
S084.201	704562	<i>Urpina</i>	
S084.244	705590	<i>Percearo</i>	
S084.260	706050, 703260, 703258, 704617, 700948, 705607, 700614, 701332, 700111, 703288	<i>K'anchillo, K'anchillo, Laram K'anchali, Chiar Sani, Villa, Urpicha, Chispiadita, Carmena, Paccosan, Yana Poq'oya</i>	
S101.148	705592, 704534, 702097, 704494, 704558	<i>Yurac Sale, Qhantus, Llutu Runtu, Yana Suyt'u, Yana Pole</i>	
S101.175	701761, 700035, 70436	<i>Llaraina, Pumaya SA-421, Choqchi Lomo</i>	
S104.157	703737	<i>Pacos</i>	
S104.176	702437, 703950	<i>Unknown, Yuraq Lomo</i>	
S104.213	704028	<i>Sanki Huayta</i>	

5.3 ÍNDICES DE DIVERSIDAD GENÉTICA DE PAPAS NATIVAS DE CHAHUAYTIRE Y CIP REPATRIADAS

Ambos grupos presentan elevados índices de diversidad, superiores a 0.5, siendo las papas nativas repatriadas por el CIP las que en promedio presentan los valores ligeramente más altos (Tabla 6).

Tabla 6. Índices de diversidad (Nei, 1973) encontrados en papas nativas de Chahuaytire y en CIP repatriadas

Loci SSR	Código de Laboratorio	Índices de Diversidad	
		Chahuaytire	CIP repatriadas
STM0019a	S011a	0.823	0.831
STM0019b	S011b	0.602	0.630
STPoAc58	S029	0.818	0.824
STM0037	S042	0.702	0.780
STM0030	S047	0.817	0.808
STM1104	S081	0.801	0.806
STM1052	S084	0.876	0.877
STM1106	S101	0.793	0.816
STM2013	S104	0.792	0.797
STM2022	S106	0.594	0.589
Promedio	-	0.762	0.776

Los loci SSR con mayores índices de diversidad fueron el STM1052 y el STM0019a; el locus SSR con menor índice de diversidad fue el STM2022. En general ambos grupos no difieren demasiado en estos valores, lo que indicaría que la diversidad encontrada en las papas cultivadas repatriadas por el CIP representa adecuadamente la diversidad de papas cultivadas encontrada en la comunidad de Chahuaytire.

5.4 ANÁLISIS DE AGRUPAMIENTO DE PAPAS NATIVAS DE CHAHUAYTIRE Y CIP REPATRIADAS

En el fenograma conjunto de los 441 cultivares de papa nativa evaluados de ambos grupos (Figura 3) se encontraron 410 perfiles de alelos microsatélite únicos, es decir patrones moleculares que consiguieron diferenciar individualmente a un cultivar. De éstos perfiles, 182 corresponden

a patrones moleculares de papas nativas de Chahuaytire, 228 pertenecen a las entradas repatriadas por el CIP y 31 perfiles moleculares que corresponden a cultivares que no fueron diferenciados individualmente en ambos grupos (*Tabla 7*). El fenograma muestra un nivel de ajuste de correlación cofenético moderado ($r = 0.6987$).

Tabla 7. Distribución de los patrones moleculares microsatélites en papas nativas de Chahuaytire y CIP repatriadas.

Grupo	Número de cultivares	Patrones moleculares diferentes	Cultivares no diferenciados
Chahuaytire	195	182 (93.33%)	13 (6.67%)
CIP repatriadas	246	228 (92.68%)	18 (7.32%)
Total	441	410 (92.98%)	31 (7.02%)

Por lo tanto, los 31 patrones moleculares (13 de papas de Chahuaytire y 18 de CIP repatriadas) que no fueron diferenciados en ambos grupos forman 13 agrupamientos con 100% de similitud genética, es decir presentaron el mismo patrón molecular SSR (*Tabla 8 y Figura 4*). En solamente 2 de éstos agrupamientos hubo una correspondencia entre los patrones moleculares de los cultivares con los nombres nativos, por ejemplo: *Wayro* y *Puka Wayro* en Chahuaytire y *Q'eq'orani* en CIP repatriadas (Grupos 1 y 8 respectivamente).

Tabla 8. Cultivares de papa nativa de la comunidad de Chahuaytire y CIP repatriadas evaluadas en 10 loci SSR que presentaron el mismo patrón SSR.

Grupo	Origen	Colecta	Nombre Nativo
1	Chahuaytire	CHA 45a	Puka Wayro
1	Chahuaytire	CHA 213	Wayro
1	Chahuaytire	CHA 45	Puka Wayro
2	Chahuaytire	CHA 67	Berendos
2	Chahuaytire	CHA 100	T'ika Pole
3	CIP repatriadas	701578	Puka Ollas
3	CIP repatriadas	704416	Wila Palma
4	Chahuaytire	CHA 19	Puka Pole
4	Chahuaytire	CHA 114	Puka Chimako
5	CIP repatriadas	704537	Churu P'itikiña
5	CIP repatriadas	703803	Misti P'itikiña
6	CIP repatriadas	703996	Cheqche Kisu
6	CIP repatriadas	706025	Puka Runtush o Cibra
7	CIP repatriadas	703951	Alq'a Sole
7	Chahuaytire	CHA 108	Puka P'itikiña
8	CIP repatriadas	703287	Azul Song'orani
8	CIP repatriadas	706134	Q'eq'orani
9	CIP repatriadas	706886	Q'ello Puywa
9	Chahuaytire	CHA 161	Lima Waq'oto
10	Chahuaytire	CHA 129	Puka Mama
10	Chahuaytire	CHA 92	T'ika Q'ompis
10	CIP repatriadas	705829	T'ika Waman
10	CIP repatriadas	704606	Puma Luntu
10	CIP repatriadas	704591	Yana P'utis
10	CIP repatriadas	701531	Yana Rukunag
11	Chahuaytire	CHA 38a	Pusi Khachun Waq'achi
11	Chahuaytire	CHA 111	Pusi Qhachun Waq'achi
12	CIP repatriadas	701332	Karmena
12	CIP repatriadas	700111	Paq'osan
13	CIP repatriadas	706050	K'anchillo
13	CIP repatriadas	703258	Laram K'anchali

5.5 ANÁLISIS DE VARIANZA MOLECULAR

El AMOVA permitió analizar la variación genética entre y dentro de los grupos de papas nativas de Chahuaytire y las papas nativas repatriadas por el CIP (Tabla 9). Este análisis revela que la mayor variación genética ocurre dentro de los grupos evaluados (99.27%) y que la variación entre ambos grupos fue mínima (0.73%). Según los valores de Φ_{st} (0.0073), esta variación genética es muy pequeña.

Tabla 9. Diseño del AMOVA, mostrando las diferencias dentro y entre los grupos de papas nativas de Chahuaytire y CIP repatriadas.

Tipo de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Componentes de varianza	Porcentaje de variación
Entre poblaciones	1	29.803	0.08415 Va	0.73
Dentro de las poblaciones	439	5046.564	11.49559 Vb	99.27
Total	440	5076.367	11.57974	
Φ_{st} 0.0073		<i>p</i> -valor = 0.05		

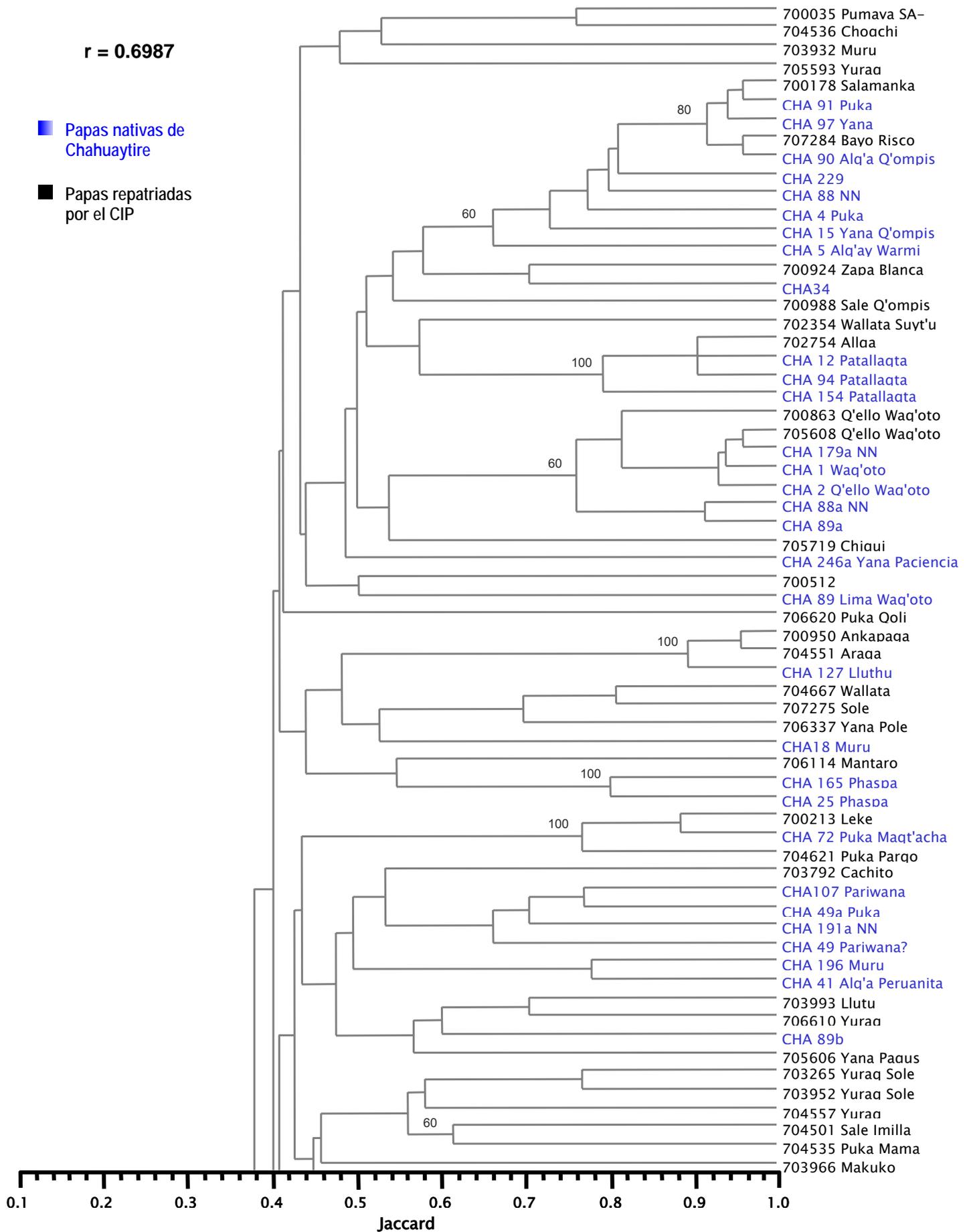
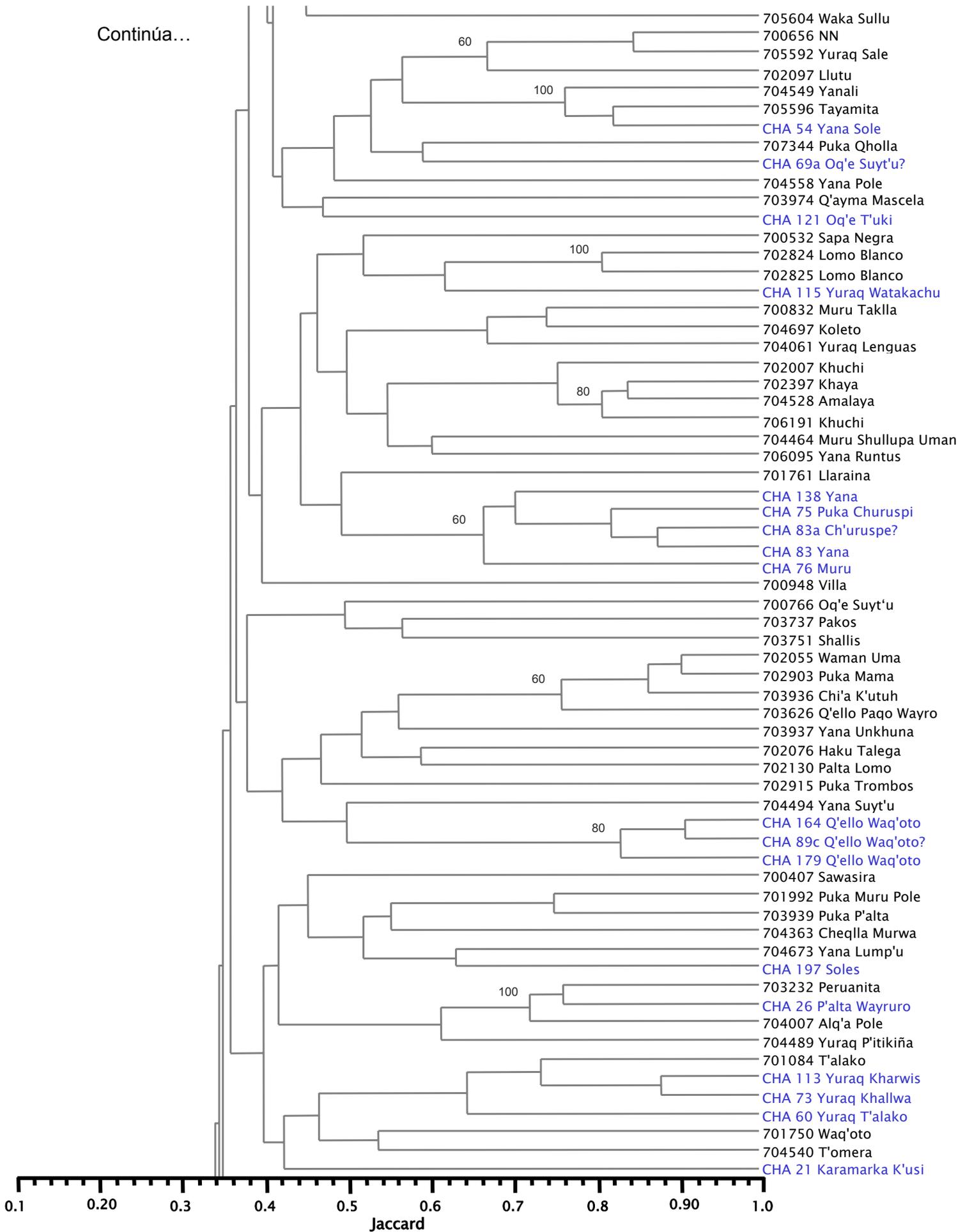
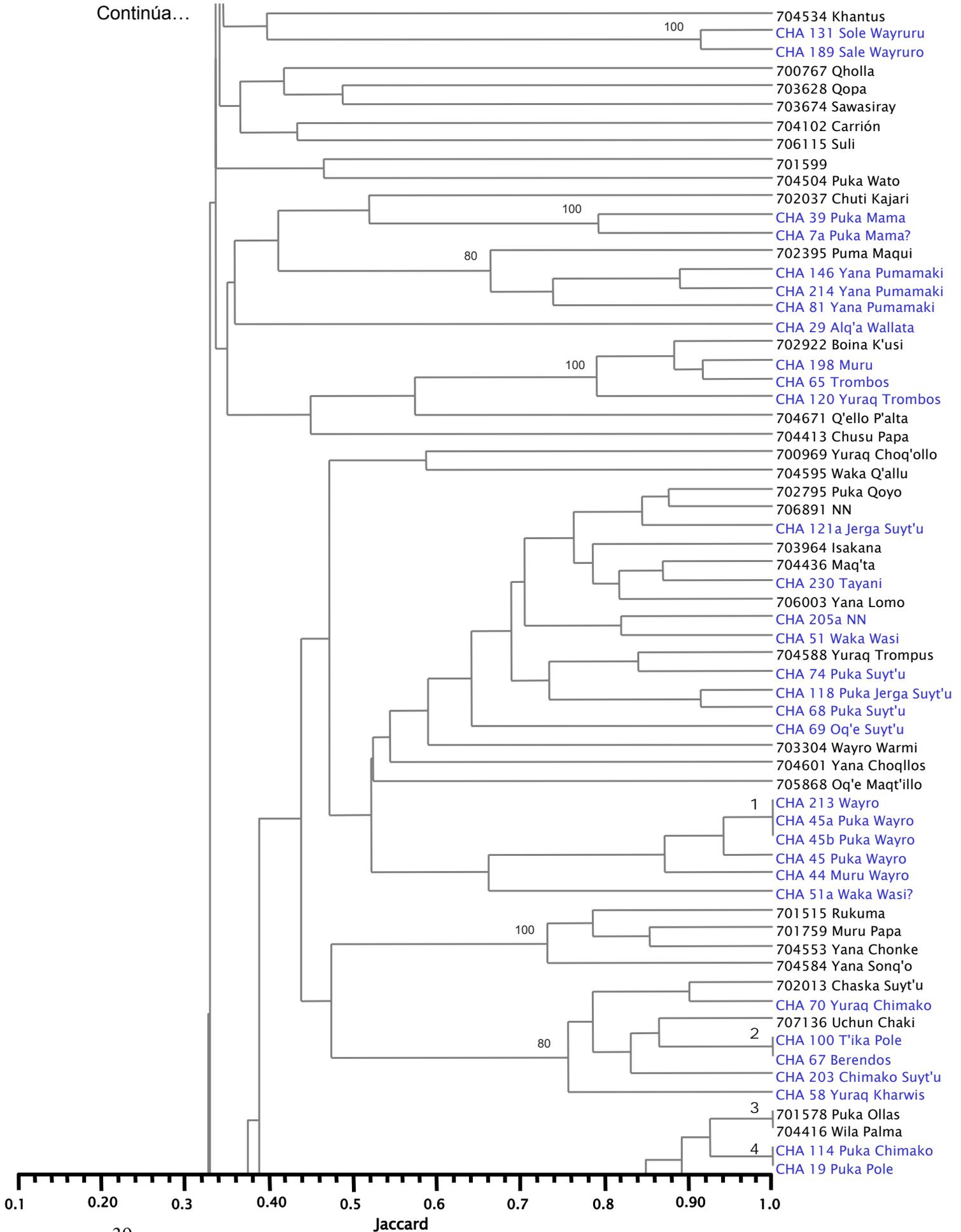


Figura 3. Fenograma de la similitud genética entre las 441 cultivares de papas nativas de Chahuaytire y CIP repatriadas obtenido del análisis de 10 loci SSR. Se indican los porcentajes de confianza mediante Bootstrap con 500 remuestréos.

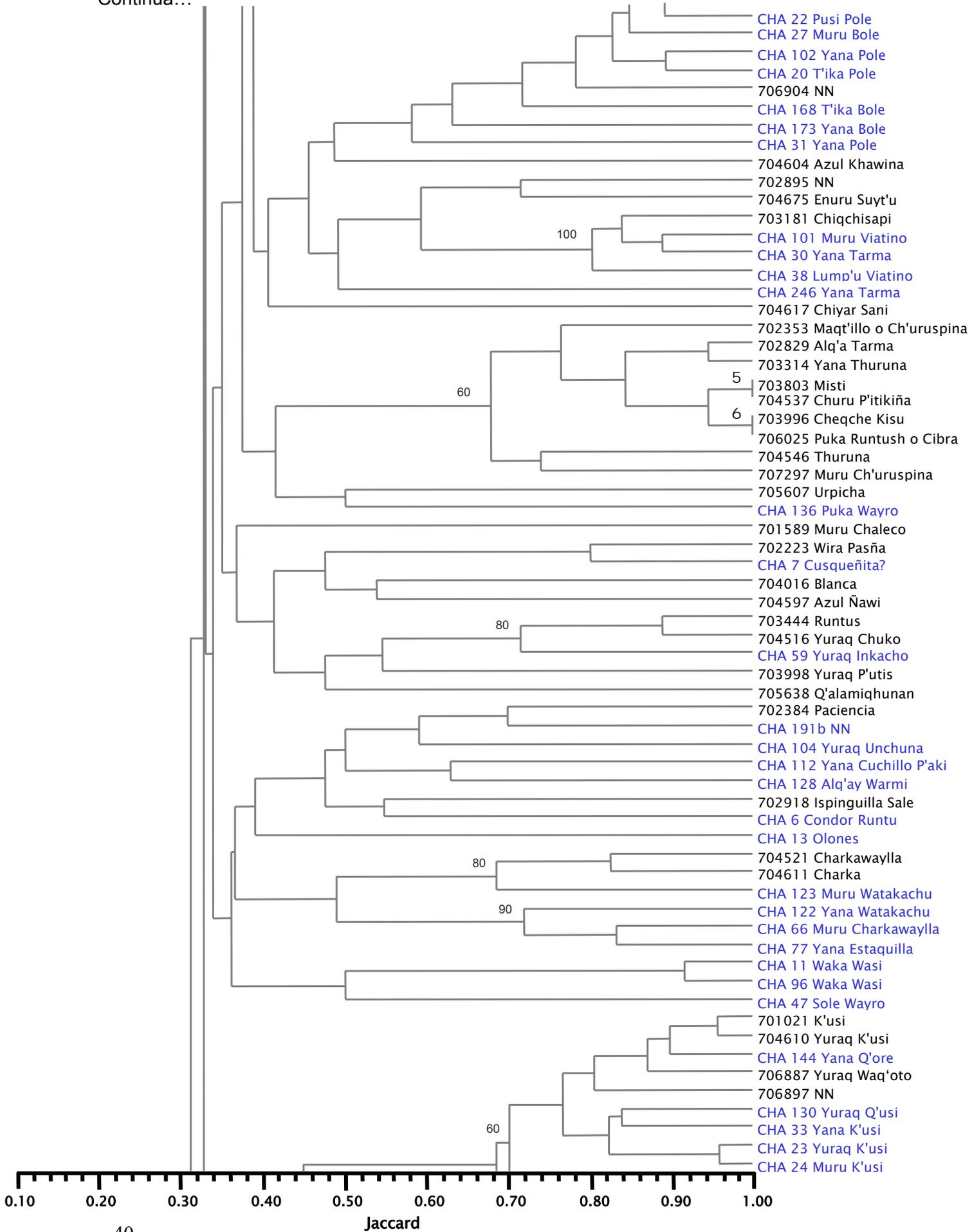
Continúa...



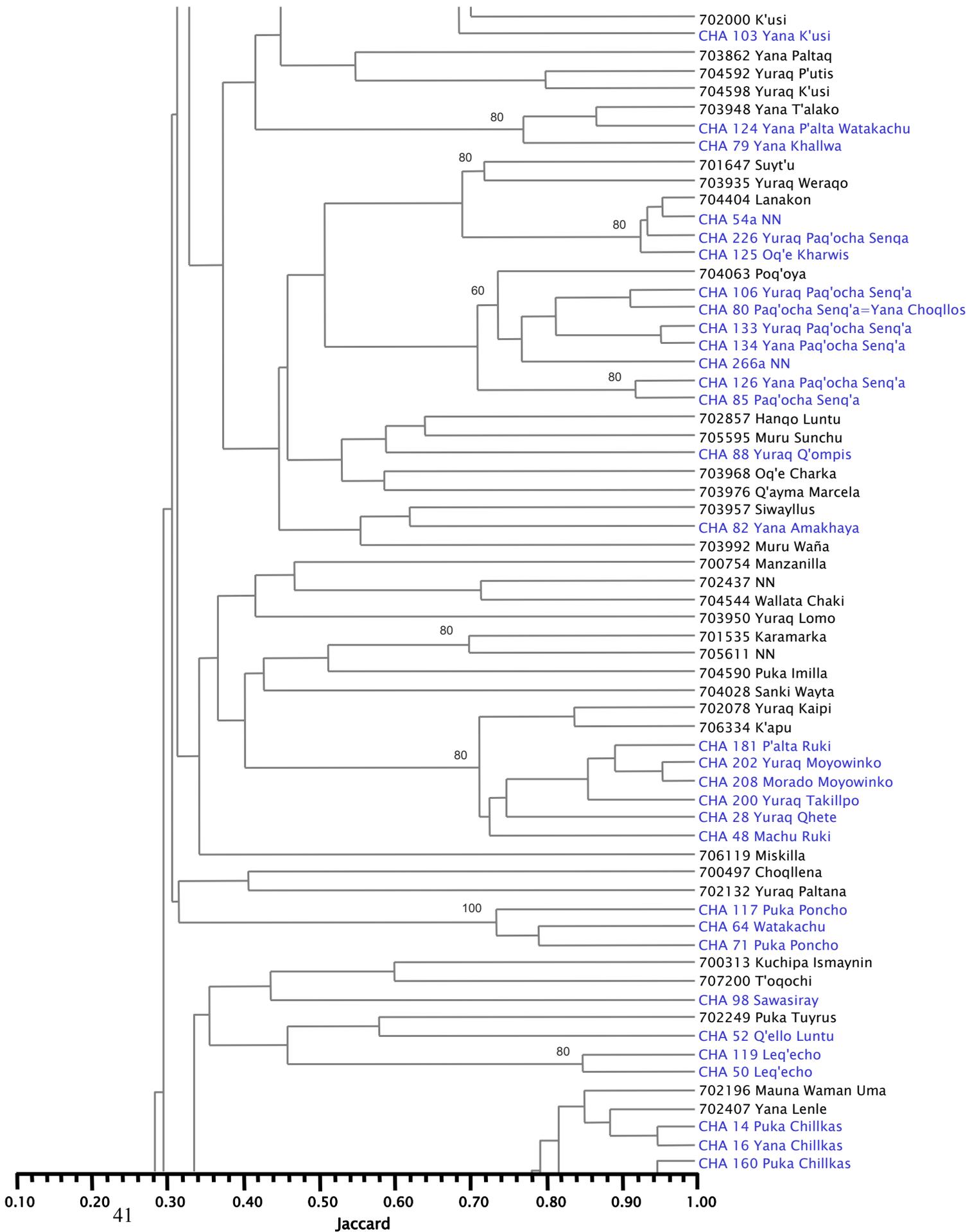
Continúa...



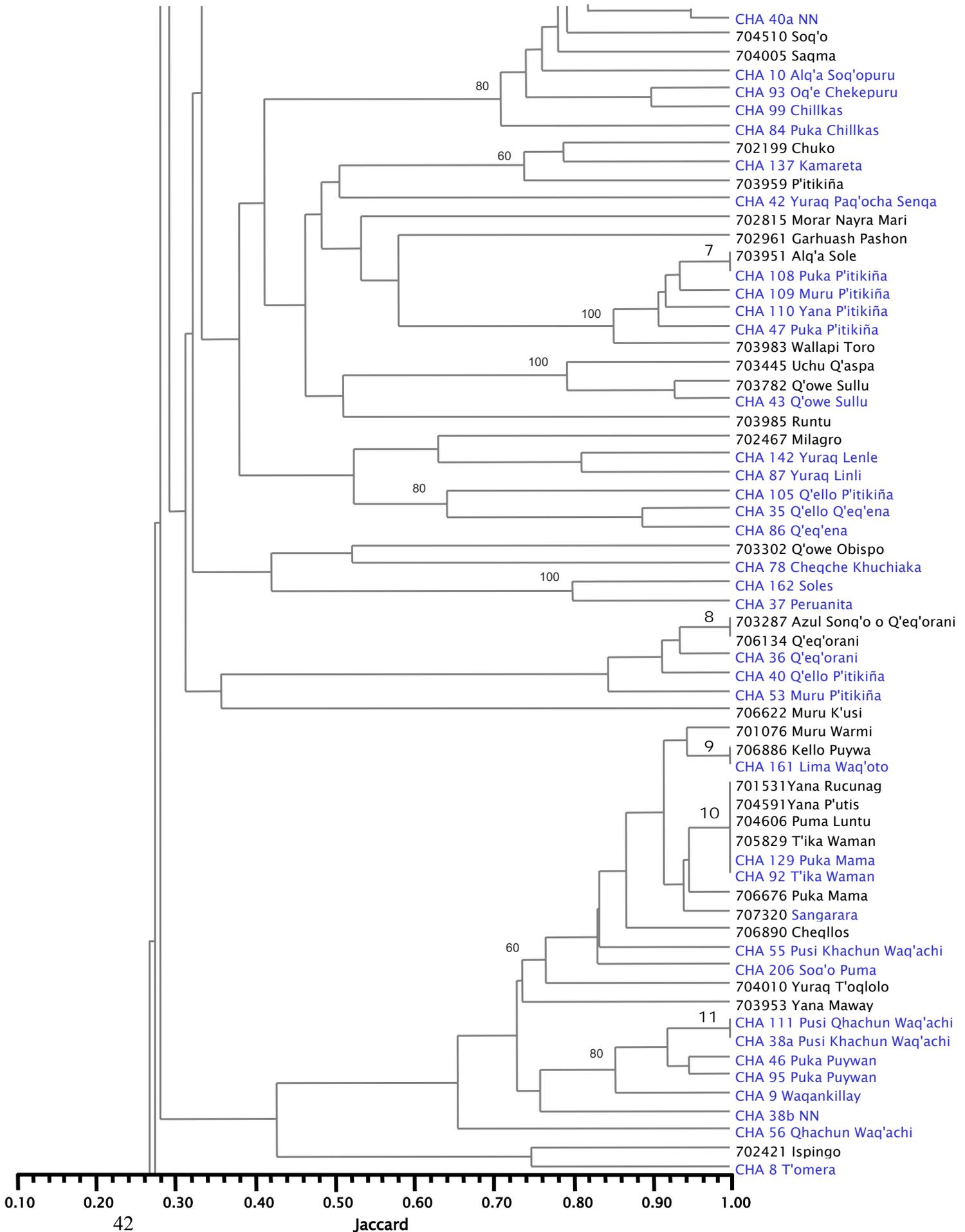
Continúa...



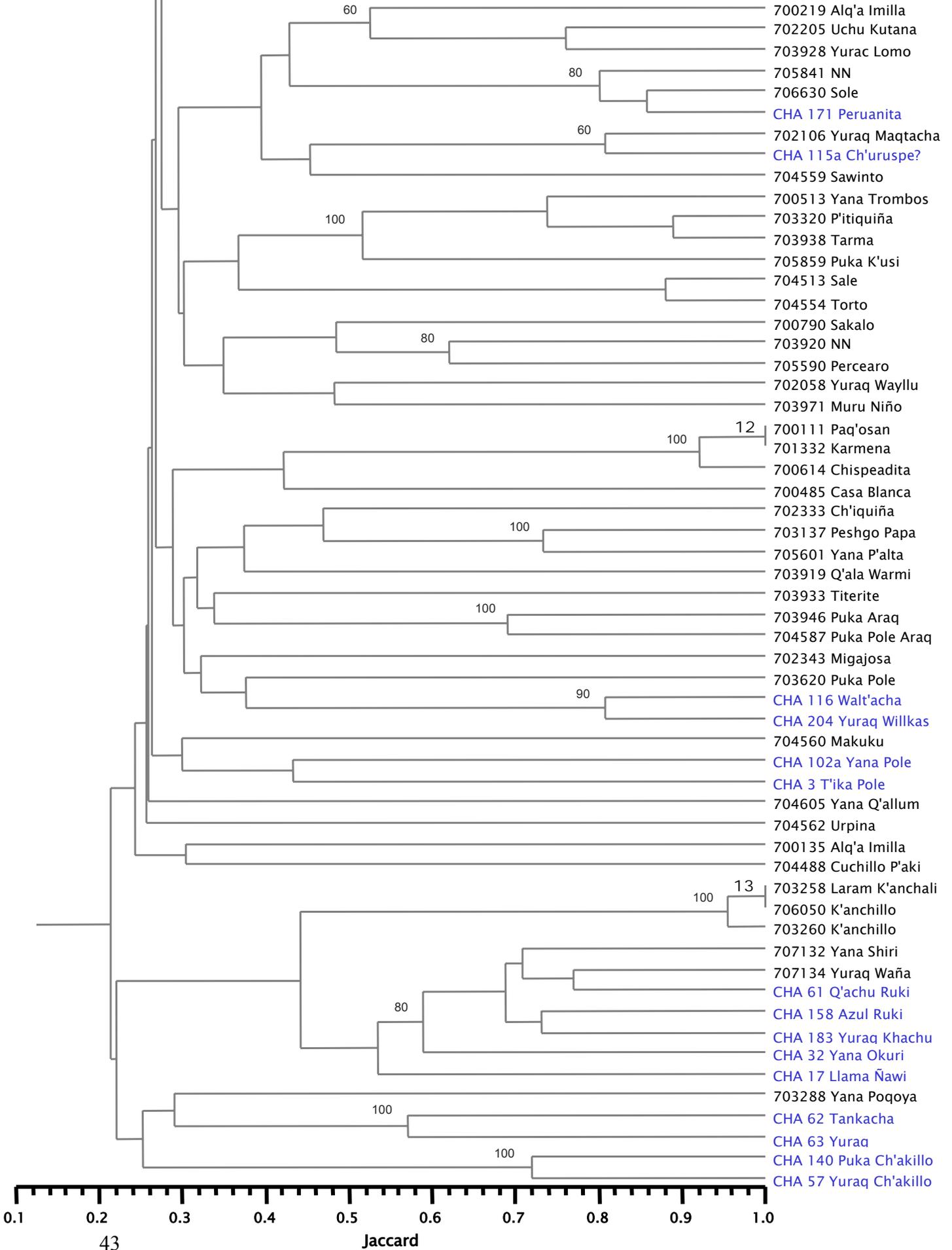
Continúa...



Continúa...



Continúa...



■ Papas nativas de Chahuaytire

■ Papas repatriadas por el CIP

Grupos con 100%
de similitud

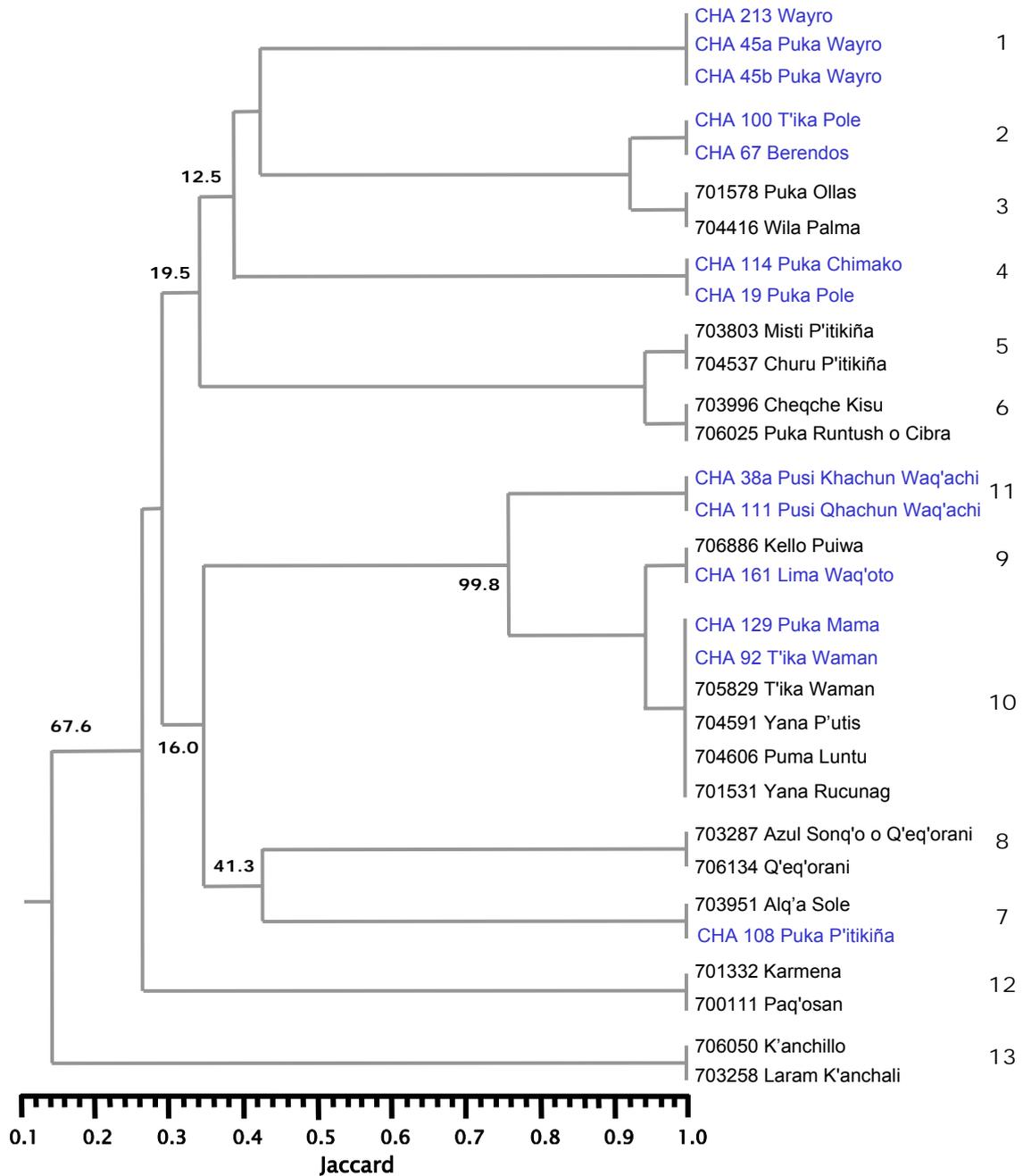


Figura 4. Fenograma de la similitud genética entre los cultivares de papas nativas de Chahuaytire y CIP repatriadas con el mismo patrón molecular en los 9 iniciadores SSR analizados. Se indican los porcentajes de confianza mediante Bootstrap con 500 remuestreos.

6. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

6.1 POLIMORFISMO DE LOS LOCI MICROSATÉLITES EN PAPAS NATIVAS DE CHAHUAYTIRE Y CIP REPATRIADAS

Los loci microsatélites con el mayor número de alelos fueron el STM0019a y el STM1052 (*Tabla 4*); a su vez ambos loci presentaron los índices de diversidad más altos (*Tabla 6*). Éstos resultados concuerdan con los trabajos reportados en *Solanum tuberosum* subsp. *andigenum* (Ames, 2003; Condori, 2003) y en especies de papa amarga (Zorrilla, 2006). El elevado polimorfismo hallado en éstos loci se debería al tipo de motivo dinucleótido compuesto AC/GT asociado con (AT)_n reportado previamente por Milbourne et al., (1998).

De otro lado, el locus que presentó el menor número de alelos y el menor índice de diversidad promedio fue el STM2022 (*Tabla 4*); resultados similares fueron obtenidos por Andrade (2001), Ames (2003), Condori (2003) y Reid & Kerr (2006). Este locus presenta un motivo repetido trinucleótido de tipo puro (*Tabla 3*), y la baja variabilidad y frecuencia de este tipo de motivos repetidos fue anteriormente reportado por Ashkenazi et al., (2001).

Este trabajo es uno de los primeros estudios de diversidad genética de papas nativas usando marcadores microsatélites en comunidades campesinas conservacionistas. La tipificación genética de los 441 cultivares de papa nativa de Chahuaytire y repatriados por el CIP mediante el análisis de 10 loci microsatélites, permitió distinguir 410 patrones moleculares diferentes (*Tabla 7*) que representan el 92.98% del total de cultivares de ambos grupos, confirmando la utilidad del kit de identificación genética de papa desarrollado en el CIP (Ghislain et al., 2004).

6.2 DIVERSIDAD GENÉTICA DE LAS PAPAS NATIVAS DE CHAHUAYTIRE Y CIP REPATRIADAS

La clasificación determinada por los marcadores moleculares demuestra una alta correspondencia con la identificación mediante nombres

locales por parte de los agricultores conservacionistas de esta comunidad (*Figura 3*). Esta precisión en la clasificación nominal de papas nativas por los campesinos conservacionistas también fue encontrada en Paucartambo, provincia cercana a la comunidad de Chahuaytire por Brush et al., (1981), Quiros et al., (1990) y Zimmerer (1991b).

Aún cuando las papas nativas de Chahuaytire y CIP repatriadas comparten la mayoría de alelos (*Tabla 4*), sólo en 3 casos el mismo patrón molecular es compartido por cultivares de ambos grupos (*Tabla 8*), confirmando que en el campo de los agricultores (*in situ*) el proceso de conservación ocurre de manera dinámica por lo que se generan nuevos cultivares constantemente (Zimmerer, 1992). Además, la presencia de alelos exclusivos en Chahuaytire sugiere una diversidad alélica que no está representada en las 246 papas nativas repatriadas por el CIP.

Las papas nativas repatriadas por el CIP presentaron mayores valores de riqueza alélica y de alelos exclusivos (*Tabla 4*) posiblemente debido a que éstos cultivares, colectados años atrás, proceden no sólo de la misma zona sino también de otras adyacentes. La repatriación de ésta diversidad genotípica del CIP a la comunidad de Chahuaytire, y al Parque de la Papa en general, sugiere la posibilidad de reemplazar y/o añadir papas nativas con mejor estado fitosanitario y así potencialmente ampliar la base genética de las papas nativas dentro de esta comunidad.

6.3 ANÁLISIS COMPARATIVO DE LAS PAPAS NATIVAS DE CHAHUAYTIRE Y CIP REPATRIADAS

Los resultados de AMOVA (*Tabla 9*) indican que la mayor variación genética de cultivares de papa nativa ocurre dentro de cada grupo (99.27%). Este hecho se explica porque la diversidad intraespecífica en las especies de papa cultivada es muy alta por lo que detectar diferencias entre grupos por origen geográfico u otro tipo es muy difícil.

El otro componente de AMOVA referido a la variación genética entre ambos grupos resultó mínimo (0.73%), y se explica porque la mayoría de alelos identificados fueron compartidos por ambos grupos (*Tabla 4*); es

decir, la diversidad genética a nivel de alelos es semejante. Sin embargo a nivel genotípico, como se observa en el fenograma (*Figura 3*), éstos fueron diferentes en su mayoría; lo que indica una alta diversidad genotípica en ambos grupos. Estos resultados concuerdan con los reportados por Brush et al., (1995) en papas nativas del Cusco por medio de isoenzimas en cuatro loci polimórficos.

Los resultados sugieren que los agricultores conservacionistas de esta comunidad mantienen una alta diversidad genética de papas nativas, formándose nuevos genotipos constantemente, pero manteniéndose la diversidad alélica.

7. CONCLUSIONES

1. Los loci microsatélites que obtuvieron mayores índices de diversidad y polimorfismo fueron el STM1052 (S084) y el STM0019a (S011a). El locus microsatélite con menor índice de diversidad y polimorfismo fue el STM2022 (S106) (*Tabla 3 y Tabla 6*).
2. Los índices de diversidad y el número de alelos fueron elevados para ambos grupos de papas nativas, indicando que presentan una alta diversidad genética, siendo un poco mayor para las papas repatriadas por el CIP. Además, se encontraron alelos exclusivos para ambos grupos, 6 para Chahuaytire y 22 para las papas repatriadas por el CIP (*Tabla 4 y Tabla 5*).
3. La genotipificación molecular usando los 10 loci SSR evaluados logró discriminar satisfactoriamente el 93.33% de los cultivares de papa nativa en Chahuaytire y el 92.68% de las repatriadas por el CIP. La caracterización molecular además permitió obtener 13 grupos (13 cultivares nativos de Chahuaytire y 18 papas nativas repatriadas por el CIP) con 100% de semejanza genética (*Tabla 7, Tabla 8 y Figura 4*).
4. Entre las papas nativas de Chahuaytire y las repatriadas por el CIP hubo una mínima variación molecular (0.73%) según el análisis AMOVA (*Tabla 9*), demostrando la representatividad genética de las papas nativas repatriadas por el CIP en la comunidad de Chahuaytire, siendo apropiadas para su integración en el germoplasma de la comunidad.

8. RECOMENDACIONES

1. Complementar el análisis molecular obtenido con análisis de ploidía, evaluaciones fenotípicas, e integrarlos a datos agronómicos, geográficos, de usos y conocimiento tradicional y etnobotánico para obtener una mejor interpretación de los resultados obtenidos.
2. Integrar la información molecular obtenida a bancos de datos con el fin de obtener un registro que sirva para fines de protección y uso en mejoramiento.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- **Alfaro G. 1997.** El Mundo Andino y sus Alimentos. Ciclo de Conferencias sobre Alimentos Andinos, 8-11 de Abril, 1996, Cochabamba, Bolivia. Universidad Mayor de San Simón, CONDESAN y Centro Internacional de la Papa (CIP), p. 5.
- **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 de Biólogo. Universidad Nacional Federico Villarreal. Lima (Perú). 95 p.
- **Asociación para la Naturaleza y el Desarrollo Sostenible (ANDES) y Asociación de Comunidades del Parque de la Papa (ACPDP). 2003.** Boletín Informativo N° 1, Tema 1. Cusco – Perú.
- **ANDES, Centro Internacional de la Papa (CIP) y ACPDP. 2005.** "Convenio para la repatriación, restauración y seguimiento de la agrobiodiversidad de papa nativa y de los sistemas de conocimiento comunitarios asociados".
<http://www.grain.org/brl_files/Convenio%20CIP.pdf>. Acceso: 31/07/05.
- **Andrade D. 2001.** Selección de la colección núcleo para *Solanum phureja* mediante el uso de marcadores microsatélites. Tesis para obtener el grado de Licenciado en Biología. Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM). Lima, Perú. 109 p.
- **Arbizu C. & M. Tapia. 1994.** Andean Tubers. In: Neglected Crops: 1492 from a Different Perspective. J.E. Hernando Bermejo and J. León (eds.). Plant Production and Protection Series No. 26. FAO, Rome, Italy, pp. 149-163. <<http://www.hort.purdue.edu/newcrop/1492/tubers.html>>. Acceso: 012/03/06.
- **Ashkenazi V., E. Chani, U. Lavi, D. Levy, J. Hillel & R. Veilleux. 2001.** Development of microsatellite markers in potato and their use in phylogenetic and fingerprinting analyses. *Genome* 44: 50-62
- **Ayad W., T. Hodking, A. Jaradat & V.R. Rao. 1997.** Molecular genetic techniques for plant genetics resources. Report of an IPGRI Workshop, October 9-11, 1995. Rome, Italy. International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy.

- **Brack, A. 2002.** Perú: País megadiverso, de recursos genéticos, de biotecnología y biocomercio. Conferencia, Octubre 10-11, 2002. Proyecto de Conservación In Situ de los Cultivos Nativos y sus Parientes Silvestres. Seminario Taller Regional sobre Cultivos Nativos y sus Parientes Silvestres, Cusco, Perú, pp. 24-32.
- **Brush S., H. Carney & Z. Huamán. 1981.** Dynamics of Andean Potato Agriculture. *Economic Botany*, 35(1), pp. 70-88.
- **Brush S. 1986.** Genetic Diversity and Conservation in Traditional Farming Systems. *J. Ethnobiol.* 6(1): 151-157.
- **Brush S. 1991.** Conservación de los Cultivos del Nuevo Continente realizada por el agricultor: El caso de las Papas Andinas, edición en español. *Diversity Vol. 7 nos. 1-2*, pp. 82-84.
- **Brush S. y E. Taylor. 1992.** Diversidad Biológica en el cultivo de papa. Capítulo 7, en: La chacra de papa, economía y ecología; E. Mayer (comp). Centro Peruano de Estudios Sociales (CEPES), 294 p.
- **Brush S. 1995.** In situ Conservation of Landraces in Centers of Crop Diversity. *Crop Sci.* 35: 346-354.
- **Brush S., R. Kesseli, R. Ortega, P. Cisneros, K. Zimmerer & C. Quiros. 1995.** Potato Diversity in the Andean Center of Crop Domestication. *Conservation Biology. Volume 9, No. 5, Octubre 1995.*
- **Brush S. 2002.** The Lighthouse and the Potato: Internalizing the Value of Crop genetic Diversity. Political Economy Research Institute, Working Paper Series, Number 37. 19 p.
- **Cadima X., J. Almanza, W. García. F. Terrazas, R. Gonzáles y A. Gandarillas. 2003.** Etnobotánica de Tubérculos Andinos en Candelaria. Capítulo V, en García, W., Cadima X. (eds.). Manejo sostenible de la agrobiodiversidad de tubérculos andinos. Síntesis de investigaciones y experiencias en Bolivia. Fundación para la Promoción y la Investigación de Productos Andinos (PROINPA), Alcaldía de Colomi, CIP, Agencia Suiza para el Desarrollo y la Cooperación (COSUDE). Cochabamba, Bolivia. 208 p.
- **Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) 1991.** Cultivo de tejidos en la Agricultura: Fundamentos y Aplicaciones. Roca, W. M. y Mroginski, L.A. (eds.). Cali, Colombia, p. xii, 970.

- **Centro Internacional de la Papa (CIP). 1997.** Molecular Biology Laboratory Protocols: Plant Genotyping. Ghislain M., D. Zhang, R. Herrera (eds.) Genetic Resources Department, Training Manual, Lima-Peru. 30 p.
- **Centro Internacional de la Papa (CIP). 2002.** Genetic Diversity Analysis by NTSYS. Curso Taller: Aplicaciones de los marcadores moleculares en la conservación y manejo de la agrobiodiversidad. Septiembre 23-Octubre 1. Lima-Perú.
- **Consejo Nacional del Medio Ambiente (CONAM), Instituto Nacional de Investigación Agraria (INIA), 2003.** Grupo Técnico Nacional de Agrodiversidad, "Documento base sobre el Programa Nacional de Agrobiodiversidad", Lima, Julio del 2003.
<http://www.conam.gob.pe/n_eventos/ProgNac-Agrobio/DBPNABD%2022-07-03.pdf>. Acceso: 08/09/2004.
- **Condori J. 2003.** Selección de la colección núcleo de *Solanum tuberosum* subsp. *andigena* basada en marcadores microsatélites. Tesis para obtener el grado de Licenciado en Biología. Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM). Lima, Perú. 96 p.
- **Coombs J., L. Frank & D. Douches. 2004.** An Applied Fingerprinting System for Cultivated potato Using simple Sequence Repeats. *Ame. J. of Potato Research* 81:243-250.
- **Cosio P., A. Peña, M. Tapia, O. Blanco, S. Torres, V. Mamani y G. Girón. 1981.** Diagnóstico Técnico Agropecuario y Socioeconómico de las comunidades de Amaru, Paru-Paru, Sacaca y Cuyo Grande. Univ. N. San Cristóbal de Huamanga. 121 p.
- **Cosio P. 1998.** Registro de la diversidad y variabilidad de papa en comunidades andinas del Cusco. En: Felipe Morales B, C., Manrique C, A. (eds.) Agrodiversidad en la región andina y amazónica: Seminario Taller. Lima-Perú, Noviembre 24-25, 1998. Comité de ONG's del Grupo Consultivo Internacional de Investigación en Agricultura (NGO-CGIAR) 2000, pp. 283-284, 290.
- **de Vicente, M. 2004.** The Evolving Role of Genebanks in the Fast-developing Field of Molecular Genetics. *Issues in Genetic Resources* No. XI, August 2004. International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy, p. 8.
- **Dueñas A., R. Mendivil, G. Lovatón & A. Loaiza. 1992.** Campesinos y papas: a propósito de la variabilidad y erosión genética en comunidades campesinas del Cusco, en: Perú: El problema agrario en debate / SEPIA IV. C. Degregori, J. Escobal. B. Marticorena (eds.). Univ. Peruana de la Amazonía, pp. 287-309.

- **Efron B., E. Halloran & S. Holmes. 1996.** Bootstrap confidence levels for phylogenetic trees. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 1342.
- **Ellegren H. 2000.** Microsatellite mutations in the germline: implications for evolutionary inference. *Trends in genetics* 16 (12): 551-558.
- **Engels F. 1970.** Exploration of the Chilca Canyon, Peru. *Current Anthropology Vol. 11 No. 1 February 1970*, pp. 55-58.
- **Estrada N. 2000.** La biodiversidad en el mejoramiento genético de la papa. Edit. PROINPA/CID/CIP. La Paz, pp. 21-27.
- **Excoffier L., P. Smouse & J. Quattro. 1992.** Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131: 479-491.
- **Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) 2004.** Pérdida de la diversidad fitogenética. FAO-Sala de Prensa. http://www.fao.org/newsroom/es/focus/2004/51102/article_51107es.html. Acceso: 04/05/06.
- **Ferreira M. y D. Grattapaglia. 1998.** Introducción al uso de marcadores moleculares en el análisis genético. EMBRAPA-CENARGEN. Brasilia. 221 p.
- **Fonseca C. y P, Julca. 2005.** Experiencia Piloto para la comercialización de la Tunta y el Chuño en el Perú, Diciembre 2004-Mayo 2005. Proyecto INCOPA/ Centro Internacional de la Papa.
- **Frankel O., A. Brown & J. Burdon. 1995.** The Conservation of Plant Biodiversity. Cambridge University Press. Cambridge-Great Britain, p. 188.
- **García W., X. Cadima, F. Terrazas & A. Gandarillas. 2003.** La Agrobiodiversidad Sostenible: Conservación *In Situ* y *Ex Situ*. Capítulo I. en García, W., Cadima X. (eds.). Manejo sostenible de la agrobiodiversidad de tubérculos andinos. Síntesis de investigaciones y experiencias en Bolivia. Fundación para la Promoción y la Investigación de productos andinos (PROINPA), Alcaldía de Colomi, CIP, Agencia Suiza para el Desarrollo y la Cooperación (COSUDE). Cochabamba, Bolivia. 208 p.

- **Ghislain M., D. Zhang, D. Fajardo, Z. Huamán & R. Hijmans. 1999.** Marker assisted sampling of the cultivated Andean potato *Solanum phureja* collection using RAPD markers. *Genetics Resources and Crop Evolution (Netherlands)* 46(6): 547-555.
- **Ghislain M., F. Rodríguez, F. Villamón, J. Núñez, R. Waugh & M. Bonierbale. 2000.** Establishment of microsatellite assays for potato genetic identification. In International Potato Center (CIP), Lima, Peru. Scientist and farmer: Partners in research for the 21st century. Program Report, 1999-2000, pp. 167-174.
- **Ghislain M., D. Spooner, F. Rodríguez, F. Villamón, J. Núñez, C. Vásquez, R. Waugh & M. Bonierbale. 2004.** Selection of highly informative and user-friendly microsatellites (SSRs) for genotyping of cultivated potato. *Theor. Appl. Genet.* 108:881-890.
- **Gómez R. y W. Roca. 2001.** Conservación en campos de agricultores de cultivares nativos de papa. En: W. Roca, R. Gómez, A. Salas y Z. Huamán: Resúmenes de trabajos realizados sobre biodiversidad en papas cultivadas y silvestres desde 1995 hasta 2001, Informe Interno CIP, 2001.
- **Gupta P. & R. Varshney. 2000.** The development and use of microsatellite markers for genetic análisis and plant breeding with emphasis on bread wheat. *Euphytica* 113: 163-185, 2000.
- **Gur-Arie R., C. Cohen, Y. Eitan, L. Shelef, E. Hallerman & Y. Kashi. 2000.** Simple Sequence repeats in *Escherichia coli*: Abundance, Distribution, Composition y Polymorphism. *Genome Research* 10:62-71.
- **Hawkes J., J. Hjerting, P. Cribb & Z. Huamán. 1972.** The Birmingham University Potato Collecting to Bolivia and Peru. Birmingham. 10 p.
- **Hawkes, J. 1988.** The evolution of cultivated potatoes and their tuber-bearing wild relatives. *Kulturpflanze (Germany)* 36:189-208.
- **Hawkes, J. 1990.** The potato evolution, biodiversity and genetic resources. London (UK). Belhaven Press. 259 p.
- **Hawkes, J. 1991.** Centros de Diversidad Genética Vegetal en Latinoamérica, ed. Es. *Diversity Vol. 7 Nos. 1 –2*, 1991, pp. 7-8.

- **Hermann M. & J. Heller. 1997.** Andean rotos and tubers: Ahipa, Arracacha, maca, yacón. Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research (IPGRI); CIP. 256 p.
- **Hillis D. & J. Bull. 1993.** An empirical test of bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogenetic analysis. *Syst. Biol.* 42(2): 182-192.
- **Hillis D., T. Heath & K. John. 2005.** Analysis and Visualization of Tree Space. *Syst. Biol.* 54(3): 471-482.
- **Holton T. 2001.** Plant Genotyping: the DNA Fingerprinting of Plants, In: Henry R.J. (ed.) Southern Cross University, Lismore, Australia. Centre for Plant Conservation Genetics, p. 344.
- **Huamán Z. 1986.** Botánica Sistemática y Morfología de la papa. Boletín de información Técnica 6. CIP, Lima-Perú, p. 6-7.
- **Huamán Z., A. Golmirzaie & W. Amoros. 1997.** The Potato. In: Fuccillo D., Sears L. and Stapleton P. (Eds.) Biodiversity in Trust. Cambridge. University Press, Cambridge, UK, p. 21-28.
- **Huamán Z. 1998.** Collection, maintenance and evaluation of potato genetic resources. *Plant Varieties and Seeds* 11, 29-38.
- **Huamán Z. 2000.** "The Breeding potential of native andean potato cultivars". Hooker, W. J. (ed.) Research for the Potato in the year 2000; Proceedings of the International Congress, International Potato Center, Lima, Peru, February 22-27, 1982, pp. 96-97.
- **Huamán Z. R, Ortíz. D, Zhang y F, Rodríguez. 2000.** Isozyme Analysis of Entire and Core Collections of *Solanum tuberosum* subsp. *andigena* Potato Cultivars. *Crop. Sci.* 40(1): 273-276.
- **Huamán Z. y R. Gómez. 2001a.** Programa Colaborativo de Conservación y Uso de la Biodiversidad de Raíces y Tubérculos Andinos, 1999-2000. En: W. Roca, R. Gómez, A. Salas y Z. Huamán: Resúmenes de trabajos realizados sobre biodiversidad en papas cultivadas y silvestres desde 1995 hasta 2001. Informe Interno CIP, 2001.
- **Huamán Z. y R. Gómez. 2001b.** Desarrollo de Bancos Comunales para la Conservación de cultivos y tubérculos andinos en el Centro del Perú, 1998. En: W. Roca, R. Gómez, A. Salas y Z. Huamán: Resúmenes de trabajos realizados sobre biodiversidad en papas cultivadas y silvestres desde 1995 hasta 2001. Informe Interno CIP, 2001.

- **Huamán Z. & D. Spooner. 2002.** Reclassification of Landrace Populations of Cultivated potatoes (*Solanum* sect. *Petota*) *American Journal of Botany* 89(6): 947-965.
- **International Institute for Environment and Development (IIED) & ANDES, 2005.** Protecting Community Rights over Traditional Knowledge: Implications of Customary Laws and Practices. Research Planning Workshop, Cusco, Peru. Mayo 20-25, 2005.
<http://www.iied.org/NR/agbioliv/bio_liv_documents/CuscoWorkshopMay05.pdf>. Acceso: 20/09/06.
- **Innovación Tecnológica y Competitividad de la Papa (INCOPA). 2003.** Rescatando un Sabor Ancestral. Centro Internacional de la Papa. Hoja Divulgativa. Año I.
- **Instituto Nacional de Estadística e Informática (INEI), 1993.** IX Censo de Población y IV Vivienda, Características Socio-Demográficas y de Vivienda de la comunidad campesina de Chahuaytire.
- **Isenegger D., P. Taylor, R. Ford, P. Franz, G. McGregor. & J. Hutchinson. 2001.** DNA fingerprinting and genetic relationships of potato cultivars (*Solanum tuberosum* L.) commercially grown in Australia. *Aust. J. Agric. Res.* 52, 911-918.
- **Jarne P. & J. Lagoda. 1996.** Microsatellites from molecules to populations and back. *Trends Ecol Evol* 11: 424–429
- **Jones C., K. Edwards, S. Castaglione, M. Winfield, F. Sala, C. van deWiel, G. Bredemeijer, B. Vosman, M. Matthes, A. Daly, R. Brettschneider, P. Bettini, M. Buiatti, E. Maestri, A. Malcevschi, N. Marmioli, R. Aert, G. Volckaert, J. Rueda, R. Linacero, A. Vazquez & A. Karp. 1997.** Reproducibility testing of RAPD, AFLP and SSR markers in plants by a network of European laboratories. *Molecular Breeding* 3: 381-390.
<<http://documents.plant.wur.nl/pri/products/biodiv/15.pdf>>. Acceso: 10/09/2004.
- **Kalinowski S. 2004.** Counting alleles with rarefaction: Private alleles and hierarchical sampling designs. *Conservation Genetics* 5: 539-543.
- **Karp A. & K. Edwards. 1995.** Molecular techniques in the analysis of the extent and distribution of genetic diversity. In: Molecular genetic techniques for plant genetic resources; Ayad W. T. Hodgkin, A. Jaradat y V. Rao (eds.) Report of an IPGRI Workshop, October 9-11, 1995. Rome, Italy, pp. 11-21.

- **Kumar L. 1999.** DNA markers in plant improvement: An overview. *Biotechnology Advances* 17: 143-182.
- **Lai Y. & F. Sun. 2003.** The Relationship Between Microsatellite Slippage Mutation Rate and The Number of Repeat Units. *Mol. Biol. Evol.* 20 (12): 2123-2131.
- **Lane L., P. Loh & B. Roe. 2001.** Workshop in Biotechnology & Recombinant DNA Techniques for Middle and High School Students and Teachers. Advanced Center for Genome Technology. University of Oklahoma Chemistry Department
<<http://www.genome.ou.edu/HHMI/workshop.pdf>>. Acceso 06/09/2004.
- **Milbourne D., R. Meyer, A. Collins, L. Ramsay, C. Gebhardt & R. Waugh. 1998.** Isolation, characterization and mapping of simple sequence repeat loci in potato. *Mol. N. Genet.* 259:233-245.
- **National Academy Press (NAP). 1989.** Lost Crops of the Incas: Little-Known Plants of the Andes with Promise for Worldwide Cultivation. Report of an Ad hoc Panel of the Advisory Committee on Technology Innovation, Board on Science and Technology for International Development, National Research Council, Washington. D.C. 1989. 428 p.
- **Nei M. 1973.** Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 70:3321-3323.
- **Núñez, J., R. Herrera, G. Trujillo, F. Guzman, D. Spooner & M. Ghislain. 2006.** Microsatellite analysis of the taxonomy of potato landraces. Poster presented in: *VI International Solanaceae Conference "Genomics meets Biodiversity"*, Wisconsin, USA, July 23-27.
<<http://solanaceae.scientific-conference.net/engine/search/index.php?func=detail&aid=281>>. Acceso: 07/07/2007.
- **Ochoa C. 1964.** Recuentos cromosómicos y determinación sistemática de papas nativas cultivadas en el Sur del Perú. *Anales Científicos. Perú* 2(1):1-41.
- **Ochoa C. 1991.** Los Andes, Cuna de la Papa. Edición en español. *Diversity Vol. 7 nos. 1-2 pp.* 48-49.
- **Ochoa C. 1999.** Las papas de Sudamérica: Perú (Parte I) Allen Press, Kansas, EE.UU. 1036 p.

- **Ortega R. 1997.** Peruvian *in situ* conservation of Andean crops, en Plant Genetic Conservation. First Edition. Edited by N. Maxted B. Ford-Lloyd y J. Hawkes, Chapman & Hall. Inglaterra, p. 307.
- **Ortiz R. 2001.** The State of the Use of Potato Genetic Diversity. In: Cooper H., Spillane C., Hodgkin T. (eds.), Broadening the Genetic Base of Crop Production. CABI Publishing, FAO and IPGRI, London, p. 183.
- **Ortíz R. & J, Engels. 2004.** Genebank management and the potential role of molecular genetics to improve the use of conserved genetic diversity. In: de Vicente, M.C.(ed.) The Evolving Role of Genebanks in the Fast-developing Field of Molecular Genetics. Issues in Genetic Resources No.11, August 2004. International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy, pp. 20, 23.
- **Otazú V. 2000.** Reconociendo a los conservadores de la diversidad de papa en: Perspectivas tecnológicas en el uso del germoplasma de papas nativas. Lima-Perú, Ministerio de Agricultura (MAG), Instituto Nacional de Investigación Agraria (INIA), Centro Internacional de la Papa (CIP), 2001, p. 36.
- **Powell W., G. Machray & J. Provan 1996.** Polymorphism revealed by simple sequence repeats. *Trends in Plant Science. Vol. 1, No. 7, 215-222.*
- **Provan J., W. Powell & R. Waugh. 1996.** Microsatellite analysis of relationships within cultivated potatoe (*Solanum tuberosum*). *Theor. Appl. Genet. 92: 1078-1084.*
- **QIAGEN 1997.** Plasmid Mini Handbook, guide for plasmid mini kit. 35 p.
- **Quiros C., S. Brush, D. Douches, K. Zimmerer & G. Huestis. 1990.** Biochemical and folk assessment of variability of Andean cultivated potatoes. *Economic Botany 44(2): 254-266.*
- **Quiros C., R. Ortega, L. van Raamsdonk, M. Herrera, P. Cisneros, E. Schmidt & S. Brush, 1992.** Increase of potato genetic resources in their center of diversity: The role of natural outcrossing and selection by the Andean farmer. *Genetic Resources and Crop Evolution (Netherlands). 39:107-113.*
- **Rao N. 2004.** Plant Genetic Resources: Advancing conservation and use through biotechnology. *African Journal of Biotechnology. Vol. 3 (2), pp.136-145.*

- **Reid A. & E. M. Kerr. 2006.** A rapid simple sequence repeat (SSR)-based identification method for potato cultivars. *Plant Genetic Resources: Characterization and Utilization* 5(1): 7-13.
- **Rohlf J. 2000.** NTSYS-pc: Numerical taxonomy and multivariate analysis system. Version 2.1 Exeter Software. Setauket. NY.
- **Sánchez I. & P. Cosío. 2000.** Experiences with support to the community potato conservation system in Cusco, Peru. En Encouraging diversity: The conservation and development of plant genetic resources. Almekinders C.y de Boef W. (eds.). Intermediate Technology Publications. Londres, pp. 237-240.
- **Salas A. & D, Spooner. 2005.** Structure, Biosystematics, and Genetic Resources, *in press*.
- **Schlötterer C. & D. Tautz, 1992.** Slippage Synthesis of Simple Sequence DNA. *Nucleic Acids Research*, 20 (2): 211-215.
- **Schneider K. & D. Douches. 1997.** Assessment of PCR-based simple sequence repeats to fingerprint North American potato cultivars. *Am. Potato J.* 74: 149-160.
- **Schneider S., D. Roessli & L. Excoffier. 2000.** Arlequin ver.2000: software for population genetics data analysis. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Switzerland.
- **Sevilla R. y Holle M. 2004.** Recursos Genéticos Vegetales. Luis León Asociados S.R.L. (Eds.) Lima, Perú. 445 p.
- **Shinde D., Y. Lai, F. Sun & N. Arnheim. 2003.** *Taq* DNA polymerase slippage rates measured by PCR and quasi-likelihood analysis: (CA/GT)_n and (A/T)_n microsatellites. *Nucleic Acids Research*, 31(3): 974-980.
- **Sneath P. & Sokal R. 1973.** Numerical Taxonomy: The Principles and Practice of Numerical Classification. Freeman ed. San Francisco, p. 573.
- **Sperling C. & S. King. 1990.** Andean tuber crops: Worldwide potential. In: J. Janick y E. Simons (eds.), *Advances in New Crops*. Timber Press, Portland, OR, pp. 428-435.
- **Spoooner D. 2003.** Demonstration of some computer packages used for question of plant systematics and diversity. Workshop, USDA-University of Wisconsin, April 8-9.

- **Spooner D. & J. Hijmans. 2001.** Potato systematics and germplasm collecting 1989-2000. *American Journal of Potato Research* 78: 237-268; 395.
- **Spooner D. y Lara, S. 2000.** Aplicaciones de los marcadores moleculares. En: Hernández, H. M. García Aldrete A.N. Alvarez F. y Ulloa M.(comp.) 2001. 1a. Edición, Enfoques contemporáneos para el estudio de la biodiversidad. Instituto de Biología, UNAM, México, pp. 57-114.
- **Spooner D., R. van den Berg, A. Rodríguez, J. Bamberg, R. Hijmans, S. Lara Cabrera. 2004.** Wild Potatoes (*Solanum* section *Petota*; *Solanaceae*) of North and Central America. SYSTEMATIC BOTANY MONOGRAPHS. Vol. 68. The American Society of Plant Taxonomist.USA, p. 13.
- **Spooner D., K. Mc Lean, G. Ramsay, R. Waugh & G. Bryan. 2005.** A single domestication for potato based on multilocus amplified fragment length polymorphism genotyping. *Proceedings of the National Academies PNAS vol 11, 41.*
<www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0507400102>. Acceso: 05/12/2006.
- **Tapia M. 1992.** Visión General y Características del Agroecosistema Andino. Capítulo I. En: El Agrosistema Andino. Anales del Taller Internacional sobre el Agrosistema Andino. Lima, Marzo 30-Abril 2. 1992, p. 58.
- **Tapia M. 1993.** Semillas Andinas. 1a edición. Consejo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación Tecnológica-CONCYTEC, Lima, p. 9, 60.
- **Tapia M, y A. De la Torre. 1997.** La mujer campesina y las semillas andinas. FAO e IPGRI. 48 p.
- **Terrazas F., G. Valdivia, R. Gonzáles y W. García. 2003.** Distribución Espacial y Temporal de Tubérculos y Raíces Andinas en el Municipio de Colomi. Capítulo IV. En: García W. y Cadima X. (Eds.). Manejo sostenible de la agrobiodiversidad de tubérculos andinos. Síntesis de investigaciones y experiencias en Bolivia. Fundación para la Promoción y la Investigación de Productos Andinos (PROINPA), Alcaldía de Colomi, CIP, Agencia Suiza para el Desarrollo y la Cooperación (COSUDE). Cochabamba, Bolivia. 208 p.
- **Tautz D. & M, Renz. 1984.** Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukariotic genomes. *Nucleic Acids Research. Vol.12: 10, 4127-4138.*
- **Ugent D. y Ochoa C. 2006.** La Etnobotánica del Perú. Desde la Prehistoria al Presente. 1a edición. CONCYTEC, Lima, p. 269.

- **Van Belkum A., S. Scherer, L. Alphen & H. Verbrugh. 1998.** Short-Sequence DNA Repeats in Prokariotic Genomes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, June 1998, pp. 275-293.
- **Vargas C. 1949.** Las Papas Sudperuanas. Parte I. Publicaciones de la Universidad Nacional del Cuzco. Cuzco-Perú, p. 144.
- **Veilleux R., L. Shen & M. Paz. 1995.** Analysis of the genetic composition of anther-derived potato by randomly amplified polymorphic DNA and simple sequence repeats. *Genome*, 38: 1153-1162.
- **Villamón F. 2000.** Caracterización de microsatélites de *Solanum tuberosum* subsp. *tuberosum* en las otras especies de papa cultivada. Tesis para optar la Licenciatura de Biología. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima-Perú. 135 p.
- **Weising K., K. Wolf, W. Meyer & H. Nybom. 1994.** DNA Fingerprinting in Plants and Fungi. CRC press, p. 240.
- **Weising K., P. Winter, B. Hüttel & G. Kalhl. 1998.** Microsatellite Markers for Molecular Breeding. In: Crop Sciences Recent Advances, The Haworth Press, pp. 113-141.
- **Yap I. & Nelson R. 1986.** Winboot UPGMA bootstrapping for binary data. International Rice Research Institute (IRRI).
- **Zamudio T. 2005.** Centros Vavilov. Centros de origen de plantas cultivadas. <<http://www.prodiversitas.bioetica.org/nota63-3.htm>>. Acceso: 20/072006.
- **Zane L., L. Bargelloni & T. Patarnello 2002.** Strategies for microsatellite isolation: a review. *Molecular Ecology*. 11, 1-16.
- **Zimmerer K. 1991a.** The regional biogeography of native potato cultivars in highland Peru, *Journal of Biogeography* 18, 165-178.
- **Zimmerer K. 1991b.** Managing diversity in potato and maize fields of the Peruvian Andes. *J. Ethnobiol.* 11(1): 23-49.
- **Zimmerer K. 1992.** The Loss and Maintenance of Native Crops in Mountain Agriculture. *GeoJournal* 27.1 61-72.

- **Zorrilla C. 2006.** Diversidad genética de cultivares nativos de papas amargas y ocas provenientes de Puno. Tesis para obtener el título de Biólogo. Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM). Lima-Perú. 185 p.

10. ANEXOS

ANEXO 1. LISTADO DE PAPAS NATIVAS DE LA COMUNIDAD DE CHAHUAYTIRE

Orden	Colecta	Nombre nativo	Orden	Colecta	Nombre nativo
1	CHA 1	Waq'oto	55	CHA 6	Condor Runtu
2	CHA 179a	NN	56	CHA 58	Yuraq Kharwis
3	CHA 2	Q'ello Waq'oto	57	CHA 67	Berendos
4	CHA 88a	NN	58	CHA 100	T'ika Pole
5	CHA 89a	Renacimiento?	59	CHA 203	Chimako Suyt'u
6	CHA 88b	NN	60	CHA 70	Yuraq Chimako
7	CHA 90	Alq'a Q'ompis	61	CHA 44	Muru Wayro
8	CHA 91	Puka Q'ompis	62	CHA 45	Puka Wayro
9	CHA 97	Yana Q'ompis	63	CHA 45b	Puka Wayro
10	CHA 229	Soq'ophoro	64	CHA 45a	Puka Wayro
11	CHA 4	Puka Q'ompis	65	CHA 213	Wayro
12	CHA 15	Yana Q'ompis	66	CHA 51a	Waka Wasi?
13	CHA 5	Alq'ay Warmi	67	CHA 51	Waka Wasi
14	CHA 12	Patallaqta	68	CHA 205a	NN
15	CHA 94	Patallaqta	69	CHA 230	Tayani
16	CHA 154	Patallaqta	70	CHA 121a	Jerga Suyt'u
17	CHA 246a	Yana Paciencia?	71	CHA 68	Puka Suyt'u
18	CHA 7a	Puka Mama?	72	CHA 118	Puka Jerga Suyt'u
19	CHA 39	Puka Mama	73	CHA 74	Puka Suyt'u
20	CHA 30	Yana Tarma	74	CHA 69	Oq'e Suyt'u
21	CHA 101	Muru Viatino	75	CHA 115	Yuraq Watakachu
22	CHA 38	Lump'u Viatino K'usi	76	CHA 136	Puka Wayro
23	CHA 13	Olonos	77	CHA 246	Yana Tarma
24	CHA 54	Yana Sole	78	CHA 64	Watakachu
25	CHA 81	Yana Pumamaki	79	CHA 71	Puka Poncho
26	CHA 146	Yana Pumamaki	80	CHA 117	Puka Poncho
27	CHA 214	Yana Pumamaki	81	CHA 29	Alq'a Wallata
28	CHA 179	Q'ello Waq'oto	82	CHA 34	Unchuna
29	CHA 89c	Q'ello Waq'oto?	83	CHA 112	Yana Cuchillo P'aki
30	CHA 164	Q'ello Waq'oto	84	CHA 128	Alq'ay Warmi
31	CHA 18	Muru T'omera	85	CHA 104	Yuraq Unchuna
32	CHA 69a	Oq'e Suyt'u?	86	CHA 191b	NN
33	CHA 72	Puka Maqt'acha	87	CHA 123	Muru Watakachu
34	CHA 41	Alq'a Peruanita	88	CHA 11	Waka Wasi
35	CHA 196	Muru Bole	89	CHA 96	Waka Wasi
36	CHA 49	Pariwana?	90	CHA 47a	Puka P'itikiña
37	CHA 49a	Puka T'omera	91	CHA 19	Puka Bole
38	CHA 107	Pariwana	92	CHA 114	Puka Chimako
39	CHA 191a	NN	93	CHA 22	Pusi Pole
40	CHA 89b	Unchuna?	94	CHA 102	Yana Pole
41	CHA 197	Soles	95	CHA 27	Muru Bole
42	CHA 121	Oq'e T'uki	96	CHA 20	T'ika Pole
43	CHA 54a	NN	97	CHA 168	T'ika Bole
44	CHA 226	Yuraq Paq'ocha Senqa	98	CHA 173	Yana bole
45	CHA 125	Oq'e Kharwis	99	CHA 31	Yana Pole
46	CHA 80	Paq'ocha Senq'a=Yana Choqillos	100	CHA 65	Trombos
47	CHA 106	Yuraq Paq'ocha Senq'a	101	CHA 198	Muru Rumpus
48	CHA 133	Yuraq Paq'ocha Senq'a	102	CHA 120	Yuraq Trombos
49	CHA 134	Yana Paq'ocha Senq'a	103	CHA 23	Yuraq K'usi
50	CHA 266a	NN	104	CHA 24	Muru K'usi
51	CHA 85	Paq'ocha Senq'a	105	CHA 33	Yana K'usi
52	CHA 126	Yana Paq'ocha Senq'a	106	CHA 130	Yuraq Q'usi
53	CHA 82	Yana Amakhaya	107	CHA 144	Yana Q'ore
54	CHA 88	Yuraq Q'ompis	108	CHA 103	Yana K'usi

Continúa...

Orden	Colecta	Nombre nativo
109	CHA 66	Muru Charkawaylla
110	CHA 77	Yana Estaquilla
111	CHA 122	Yana Watakachu
112	CHA 79	Yana Khallwa
113	CHA 124	Yana P'alta Watakachu
114	CHA 21	Karamarka K'usi
115	CHA 60	Yuraq T'alako
116	CHA 73	Yuraq Khallwa
117	CHA 113	Yuraq Kharwis
118	CHA 25	Phaspa Sunchu
119	CHA 165	Phaspa Sunchu
120	CHA 26	P'alta Wayruro
121	CHA 127	Lluthu Runtu
122	CHA 131	Sole Wayruru
123	CHA 189	Sale Wayruro
124	CHA 115a	Ch'uruspe?
125	CHA 171	Peruanita
126	CHA 7	Cusqueñita?
127	CHA 42	Yuraq Paq'ocha Senqa
128	CHA 43	Q'owe Sullu
129	CHA 47	Sole Wayro
130	CHA 108	Puka P'itikiña
131	CHA 109	Muru P'itikiña
132	CHA 110	Yana P'itikiña
133	CHA 137	Kamareta
134	CHA 10	Alq'a Soq'opuru
135	CHA 14	Puka Chillkas
136	CHA 16	Yana Chillkas
137	CHA 40a	NN
138	CHA 160	Puka Chillcas
139	CHA 93	Oq'e Chekepuru
140	CHA 99	Chillkas
141	CHA 84	Puka Chillkas
142	CHA 36	Q'eq'orani
143	CHA 40	Q'ello P'itikiña
144	CHA 53	Muru P'itikiña
145	CHA 50	Leq'echo
146	CHA 119	Leq'echo
147	CHA 52	Q'ello Luntus
148	CHA 75	Puka Churuspi
149	CHA 83	Yana Churuspi
150	CHA 83a	Ch'uruspe?
151	CHA 138	Yana Churuspe
152	CHA 76	Muru Ch'uruspi
153	CHA 35	Q'ello Q'eq'ena
154	CHA 86	Q'eq'ena
155	CHA 105	Q'ello P'itikiña
156	CHA 87	Yuraq Linli
157	CHA 142	Yuraq Lenle
158	CHA 98	Sawasiray
159	CHA 37	Peruanita
160	CHA 162	Soles
161	CHA 78	Cheqche Khuchiaka
162	CHA 8	T'omera

Orden	Colecta	Nombre nativo
163	CHA 9	Waqankillay
164	CHA 38a	Pusi Khachun Waq'achi
165	CHA 111	Pusi Qhachun Waq'achi
166	CHA 46	Puka Puywan
167	CHA 95	Puka Puywan
168	CHA 38b	NN
169	CHA 55	Pusi Khachun Waq'achi
170	CHA 92	T'ika Waman
171	CHA 129	Puka Mama
172	CHA 161	Lima Waq'oto
173	CHA 206	Soq'o Puma Luntu
174	CHA 56	Qhachun Waq'achi
175	CHA 89	Lima Waq'oto?
176	CHA 59	Yuraq Inkacho
177	CHA 17	Llama Ñawi
178	CHA 32	Yana Okuri
179	CHA 61	Q'achu Ruki
180	CHA 158	Azul Ruki
181	CHA 183	Yuraq Khachu Ruki
182	CHA 28	Yuraq Qhete
183	CHA 181	P'alta Ruki
184	CHA 202	Yuraq Moyowinko
185	CHA 208	Morado Mollowinki
186	CHA 200	Yuraq Takillpo
187	CHA 48	Machu Ruki
188	CHA 3	T'ika Pole
189	CHA 102a	Yana Pole?
190	CHA 116	Walt'acha
191	CHA 204	Yuraq Willkas
192	CHA 57	Yuraq Ch'akillo
193	CHA 140	Puka Ch'akillo
194	CHA 62	Tankacha
195	CHA 63	Yuraq Suyt'u

**ANEXO 2. LISTADO DE PAPAS NATIVAS REPATRIADAS POR EL CIP A LA
COMUNIDAD DE CHAHUAYTIRE**

Orden	Código CIP	Nombre nativo	Especie	Orden	Código CIP	Nombre nativo	Especie
1	700313	Khuchipa Ismaynin	STN	55	700178	Salamanka o Yana Imilla	ADG
2	700407	Sawasira	STN	56	700832	Muru Taklla	ADG
3	700532	Sapa Negra	ADG	57	700863	Q'ello Waq'oto	ADG
4	701076	Muru Warmi	CHA	58	700924	Zapa Blanca	ADG
5	701531	Yana Rukunaq	CHA	59	700969	Yuraq Choq'ollo	ADG
6	701589	Muru Chaleco	ADG	60	700988	Sale Q'ompis	ADG
7	702196	Mauna Waman Uma	CHA	61	701515	Rukuma	ADG
8	702199	Chuko P'itikiña	STN	62	701647	Suyt'u	ADG
9	702223	Wira Pasña	STN	63	701759	Muru Papa	ADG
10	702249	Puka Tuyrus	GON	64	702007	Khuchi Chuqchan	ADG
11	702353	Maqt'illo o Churuspina	STN	65	702013	Chaska Suyt'u	CHA
12	702407	Yana Lenle	CHA	66	702132	Yuraq Paltana	ADG
13	702421	Ispingo	STN	67	702354	Wallata Suyt'u	ADG
14	702467	Milagro	GON	68	702397	Khaya	ADG
15	702824	Lomo Blanco	ADG	69	702754	Allqa Mallqo	ADG
16	702825	Lomo Blanco	ADG	70	702795	Puka Qoyo	ADG
17	702829	Alq'aTarma	ADG	71	702815	Morar Nayra Mari	CHA
18	702961	Garhuash Pashon	GON	72	703287	Azul Song'o o Q'eq'orani	CHA
19	703302	Q'owe Obispo	CHA	73	703304	Wayro Warmi	CHA
20	703314	Yana Thuruna	STN	74	703628	Qopa	ADG
21	703444	Runtus P'itikiña	GON	75	703674	Sawasiray	ADG
22	703445	Uchu Q'aspa	STN	76	703935	Yuraq Weraqo	ADG
23	703782	Q'owe Sullu	STN	77	703964	Isakana	ADG
24	703803	Misti P'itikiña	STN	78	703993	Llutu Runtu	ADG
25	703951	Alq'a Sole	ADG	79	704102	Carrion	ADG
26	703953	Yana Maway	CHA	80	704404	Lanakon	ADG
27	703959	P'itikiña	STN	81	704436	Maqt'a	ADG
28	703971	Muru Niño	ADG	82	704464	Muru Shullupa Uman	ADG
29	703983	Wallapi Toro	STN	83	704494	Yana Suyt'u	ADG
30	703985	Runtu	GON	84	704528	Amalaya	ADG
31	703996	Cheqche Kisu	STN	85	704553	Yana Chonke	ADG
32	703998	Yuraq P'uti	STN	86	704584	Yana Song'o Waqollo	ADG
33	704005	Saqma	ADG	87	704588	Yuraq Trompus	ADG
34	704010	Yuraq T'oqlolo	CHA	88	704595	Waka Q'allu	ADG
35	704510	Soq'o	ADG	89	704601	Yana Choqllus	ADG
36	704516	Yuraq Chuko	GONxSTN	90	704604	Azul Khawina	ADG
37	704521	Charkawaylla	ADG	91	704667	Wallata	ADG
38	704537	Churu P'itikiña	CHA	92	704697	Koleto	ADGxADG
39	704546	Thuruna	ADG	93	705606	Yana Paqus	ADG
40	704560	Makuku	ADG	94	705607	Urpicha	CHA
41	704591	Yana P'utis	CHA	95	705608	Q'ello Waq'oto	ADG
42	704606	Puma Luntu	CHA	96	705719	Chiqui Bonita	ADG
43	704611	Charka	ADG	97	705868	Oq'e Maqt'illo	ADG
44	704673	Yana Lump'u	ADG	98	706003	Yana Lomo	ADG
45	705638	Q'alamiqhunan	STN	99	706095	Yana Runtu	ADG
46	705829	T'ika Waman	CHA	100	706115	Suli	ADG
47	706025	Puka Runtush o Cibra	STN	101	706191	Khuchi Chuqchan	ADG
48	706134	Q'eq'orani	STN	102	706337	Yana Pole	ADG
49	706676	Puka Mama	CHA	103	706610	Yuraq Mestiza	ADG
50	706886	Q'ello Puywa	STN	104	706620	Puka Qoli	ADG
51	706890	Cheqllus	CHA	105	706891	NN	ADG
52	707200	T'oqochi	STN	106	707136	Uchun Chaki	CHA
53	707297	Muru Ch'uruspina	STN	107	707275	Sole	ADG
54	707320	Sangarara	CHA	108	707284	Bayo Risco	ADG

Continúa...

Orden	Código CIP	Nombre nativo	Especie	Orden	Código CIP	Nombre nativo	Especie
109	700035	Pumaya SA-241	ADG	163	700497	Choqllena	ADG
110	700213	Leke Chaki	ADG	164	700513	Yana Trombus	ADG
111	700512	Tulpina	ADG	165	700754	Manzanilla	ADG
112	700656	NN	ADG	166	700767	Qholla	ADG
113	700766	Oq'e Suyt'u	ADG	167	700948	Villa	ADG
114	701535	Karamarka	ADG	168	701021	K'usi	ADG
115	701578	Puka Ollas	ADG	169	701084	T'alako	ADG
116	701761	Llaraina	ADG	170	701599	Runtus	ADG
117	701992	Puka Muru Pole	ADG	171	701750	Waq'oto	ADG
118	702055	Waman Uma	ADG	172	702000	K'usi	ADG
119	702076	Haku Talega	ADG	173	702037	Chuti Kajari	ADG
120	702097	Llutu Runtu	ADG	174	702058	Yuraq Wayllu	ADG
121	702106	Yuraq Maqtacha	ADG	175	702333	Ch'ikiña	STN
122	702130	Palta Lomo	ADG	176	702395	Puma Maki	ADG
123	702384	Paciencia o Paqo Senq'a	ADG	177	702437	NN	ADG
124	702857	Hanqo Luntu	ADG	178	702895	NN	ADG
125	702903	Puka Mama	ADG	179	702922	Boina K'usi	ADG
126	702915	Puka Trombos	ADG	180	703137	Peshgo Papa	ADG
127	702918	Ispinguilla Sale	ADG	181	703181	Chiqchisapi	ADG
128	703232	Peruanita	ADG	182	703320	P'itikiña	STN
129	703265	Yuraq Sole	ADG	183	703862	Yana Paltaq	ADG
130	703626	Q'ello Paqo Wayro	ADG	184	703919	Q'ala Warmi	ADG
131	703737	Pakos	ADG	185	703933	Titerite	STN
132	703751	Shallis	ADG	186	703938	Tarma	ADG
133	703792	Cachito	ADG	187	703946	Puka Araq	ADG
134	703932	Muru T'alako	ADG	188	703948	Yana T'alako	ADG
135	703936	Ch'ia K'utuh	ADG	189	703957	Siwayllus	ADG
136	703937	Yana Unkhuna	ADG	190	703974	Q'ayma Mascela	ADG
137	703939	Puka P'alta	ADG	191	703992	Muru Waña	ADG
138	703950	Yuraq Lomo	ADG	192	704016	Blanca	ADG
139	703952	Yuraq Sole	ADG	193	704028	Sanki Wayta	STN
140	703966	Makuko	ADG	194	704413	Chusu Papa	ADG
141	703968	Oq'e Charka	ADG	195	704416	Wila Palma	ADG
142	703976	Q'ayma Marcela	ADG	196	704504	Puka Wato	ADG
143	704007	Alq'a Pole	ADG	197	704513	Sale	ADG
144	704061	Yuraq Lenguas	ADG	198	704534	Khantus	ADG
145	704063	Poq'oya	ADG	199	704540	T'omera	ADG
146	704363	Cheqlla Murwa	ADG	200	704544	Wallata Chaki	ADG
147	704489	Yuraq P'itikiña	ADG	201	704554	Torto Lomo	ADG
148	704501	Sale Imilla	ADG	202	704587	Puka Pole Araq	ADG
149	704535	Puka Mama	ADG	203	704592	Yuraq P'utis	ADG
150	704536	Choqchi Lomo	ADG	204	704597	Azul Ñawi	ADG
151	704549	Yanali	ADG	205	704598	Yuraq K'usi	ADG
152	704557	Yuraq Sawinto	ADG	206	704610	Yuraq K'usi	ADG
153	704558	Yana Pole	ADG	207	704617	Chiyar Sani	ADG
154	704590	Puka Imilla	ADG	208	704671	Q'ello P'alta	ADG
155	704621	Puka Parqo	ADG	209	704675	Enuru Suyt'u	ADG
156	705592	Yuraq Sale	ADG	210	705601	Yana P'alta	ADG
157	705593	Yuraq K'usi	ADG	211	705859	Puka K'usi	ADG
158	705595	Muru Sunchu	ADG	212	706114	Mantaro	ADG
159	705596	Tayamita	ADG	213	706622	Muru K'usi	ADG
160	705604	Waka Sullu	ADG	214	706887	Yuraq Waq'oto	ADG
161	705611	NN	ADG	215	706897	NN	ADG
162	707344	Puka Qholla	ADG	216	706904	NN	ADG

Continúa...

Orden	Código CIP	Nombre nativo	Especie
217	700111	Paq'osan	STN
218	700135	Alq'a Imilla	STN
219	700219	Alq'a Imilla	STN
220	700485	Casa Blanca	STN
221	700614	Chispeadita	STN
222	700790	Sakalo	STN
223	700950	Ankapaga	STN
224	701332	Karmena	STN
225	702078	Yuraq Kaipi	JUZ
226	702205	Uchu Kutana	STN
227	702343	Migajosa	STN
228	703258	Laram K'anchali	JUZ
229	703260	K'anchillo	JUZ
230	703288	Yana Poqoya	STN
231	703620	Puka Pole	STN
232	703920	NN	STN
233	703928	Yuraq Lomo	STN
234	704488	Cuchillo P'aki	STN
235	704551	Araqa	STN
236	704559	Sawinto	STN
237	704562	Urpina	STN
238	704605	Yana Q'allum	STN
239	705590	Percearo	STN
240	705841	NN	STN
241	706050	K'anchillo	JUZ
242	706119	Miskilla	STN
243	706334	K'apu	JUZ
244	706630	Sole	STN
245	707132	Yana Shiri	CUR
246	707134	Yuraq Waña	CUR

ANEXO 3. SECUENCIAMIENTO DEL PLÁSMIDO pUC 18

El método usado es el de **terminación de cadena de Sanger**, también conocido por el **método didesoxi**. Antes de llevar a cabo este método, previamente se obtiene gran cantidad de plásmidos, que son clonados en un vector apropiado, en este caso la bacteria transformada *Escherichia coli* cepa *E010* procediéndose a realizar la extracción de los plásmidos según la metodología implementada en laboratorio (ANEXO 4). Las cepas transformadas de *E. coli* no solamente contienen el ADN genómico que codifican la información requerida para su crecimiento y replicación, si no también llevan pequeñas moléculas de ADN circular de replicación autónomas llamadas plásmidos (Lane et al., 2001).

Aunque los plásmidos no codifican genes que se requieren para el normal crecimiento bacteriano, sí contienen genes que pueden dar a las células ventajas selectivas bajo ciertas condiciones de crecimiento. El plásmido pUC 18 codifica un gen para la resistencia a Ampicilina (Amp^r), convirtiéndolo en un vehículo o vector para la transferencia de genes de un organismo a otro. De esta forma, al producirse el crecimiento de *E. coli* en un medio con Ampicilina, solamente se detectan aquellas bacterias que llevan el plásmido recombinante, capaces de crecer en medios con este antibiótico, seleccionando y/o enriqueciendo a aquellas que llevan el plásmido. Para obtener la secuencia de bases nitrogenadas del plásmido pUC 18, se necesitan los siguientes componentes:

- El templado, en este caso el plásmido pUC 18 a una concentración de 1-2 μ mol.
- El iniciador, que suele ser un oligonucleótido corto de 24 bases de longitud, lo necesario para que la enzima ADN polimerasa I comience a añadir nucleótidos por el extremo 3' OH. Este iniciador posee una secuencia de bases nitrogenadas complementaria al vector, además este iniciador procede de una región del vector muy cercana al punto de inserción del plásmido, cuya secuencia es conocida.
- Los cuatro desoxinucleótidos trifosfato (dATP, dCTP, dGTP y dTTP).
- Nucleótidos di/desoxi (ddATP, ddTTP, ddCTP y ddGTP) Los nucleótidos didesoxi son nucleótidos modificados que han perdido el grupo hidroxilo de la posición 3' de la desoxirribosa. Estos nucleótidos pueden incorporarse a la cadena de ADN naciente, pero no es posible que se una a ellos ningún otro nucleótido por el extremo 3'. Por lo tanto, una vez incorporado un nucleótido didesoxi se termina la síntesis de la cadena de ADN.

La preparación de la mezcla de PCR del plásmido requiere cuatro mezclas de reacción diferente. Cada mezcla de reacción contiene los cuatro desoxinucleótidos trifosfato (dATP, dCTP, dTTP y dGTP), ADN polimerasa I, y un nucleótido didesoxi, por ejemplo ddATP, a una concentración baja. El nucleótido didesoxi utilizado (ddATP en este ejemplo) competirá con su homólogo (dATP) por incorporarse a la cadena de ADN que se está sintetizando, produciendo la terminación de la síntesis en el momento y lugar donde se incorpora.

Por este sistema, en cada mezcla de reacción se producen una serie de moléculas de ADN de nueva síntesis de diferente longitud que terminan todas en el mismo nucleótido. Los fragmentos de ADN de nueva síntesis obtenidos en cada mezcla de reacción se separan por tamaños mediante electroforesis en geles verticales de poliacrilamida al 6% muy finos (0,4 mm de espesor) y de gran longitud (cerca de 40 cm) que permiten distinguir fragmentos de ADN que se diferencian en un solo nucleótido. Los productos de cada una de las cuatro mezclas de reacción se colocan en los pocillos del gel en cuatro carriles marcados (*Figura 5*).

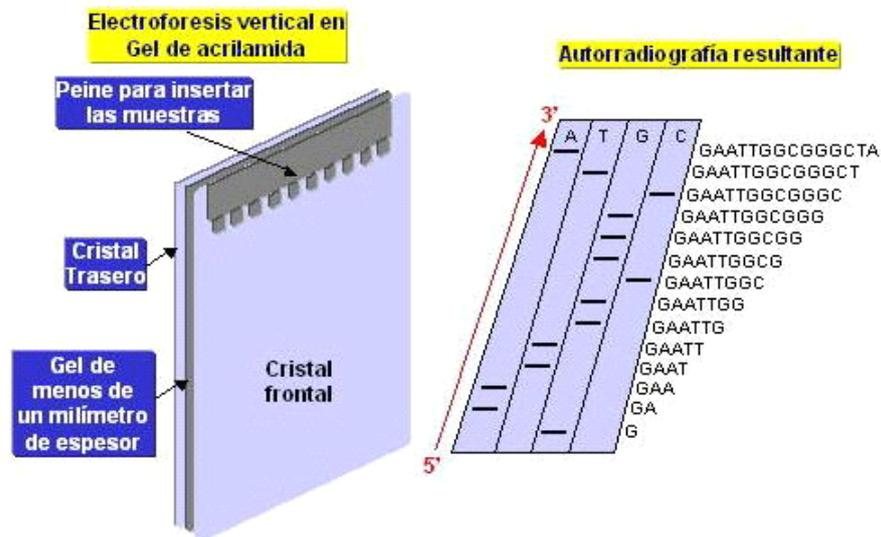


Figura 5. Esquema que muestra la electroforesis vertical y visualización, en gel de poliacrilamida, del secuenciamiento del plásmido pUC 18.

Terminada la electroforesis, se detectan las bandas por medio de la técnica de tinción con nitrato de plata. La aparición de una banda en una posición concreta del gel, en uno de los cuatro carriles nos indica que en ese punto de la secuencia del ADN de nueva síntesis (complementario a la secuencia del plásmido molde) está la base correspondiente al nucleótido didesoxi utilizado en la mezcla de reacción inicial.

Teniendo en cuenta que el ADN de nueva síntesis crece en la dirección 5' → 3', si comenzamos a leer el gel por los fragmentos de menor tamaño (extremo 5') y avanzamos aumentando el tamaño de los fragmentos (hacia el extremo 3'), obtendremos la secuencia del ADN de nueva síntesis en la dirección 5' → 3'.

La secuencia de nucleótidos del plásmido pUC 18 y la composición del iniciador utilizado se muestran a continuación:

Secuencia del plásmido pUC 18

```

TCGCGCGTTT CGGTGATGAC GGTGAAAACC TCTGACACAT GCAGCTCCCG GAGACGGTCA 60
CAGCTTGTCT GTAAGCGGAT GCCGGGAGCA GACAAGCCCG TCAGGGCGCG TCAGCGGGTG 120
TTGGCGGGTG TCGGGGCTGG CTTAACTATG CGGCATCAGA GCAGATTGTA CTGAGAGTGC 180
ACCATATGCG GTGTGAAATA CCGCACAGAT GCGTAAGGAG AAAATACCGC ATCAGGCGCC 240
ATTCGCCATT CAGGCTGCGC AACTGTTGGG AAGGGCGATC GGTGCGGGCC TCTTCGCTAT 300
TACGCCAGCT GGCGAAAGGG GGATGTGCTG CAAGGCGATT AAGTTGGGTA AGGCCAGGGT 360
TTTCCAGTC AGGACGTTGT AAAACGACGG CCAGTGCCAA GCTTGCATGC CTGCAGGTCG 420
                29          39          49          59          69
ACTCTAGAGG ATCCCCGGGT ACCGAGCTCG AATTCGTAAT CATGGTCATA GCTGTTTCCT 480
                79          89          99          109         119         129
GTGTGAAATT GTTATCCGCT CACAATTCCA CACAACATAC GAGCCGGAAG CATAAAGTGT 540
                139         149         159         169         179         189
AAAGCCTGGG GTGCCTAATG AGTGAGCTAA CTCACATTAA TTGCGTTGCG CTCACTGCC 600
                199         209         219         229         239         249
GCTTTCCAGT CGGGAAACCT GTCGTGCCAG CTGCATTAAT GAATCGGCCA ACGCGCGGGG 660
                259         269         279         289         299         309
AGAGGCGGTT TGCGTATTGG GCGCTCTTCC GCTTCCTCGC TCACTGACTC GCTGCGCTCG 720
                319         329         339         349         359         369
GTCGTTTCGGC TGCGGCGAGC GGTATCAGCT CACTCAAAGG CGGTAATACG GTTATCCACA 780
                429
GAATCAGGGG ATAACGCAGG AAAGAACATG TGAGCAAAAAG GCCAGCAAAA GGCCAGGAAC 840
                489
CGTAAAAAGG CCGCGTTGCT GCGGTTTTTC CATAGGCTCC GCCCCCTGA CGAGCATCAC 900
AAAAATCGAC GCTCAAGTCA GAGGTGGCGA AACCCGACAG GACTATAAAG ATACCAGGCG 960
TTTCCCCCTG GAAGCTCCCT CGTGCGCTCT CCTGTTCCGA CCCTGCCGCT TACCGGATAC 1020
CTGTCCGCTT TTCTCCCTTC GGGAAAGCGT GCGCTTTCTC ATAGCTCACG CTGTAGGTAT 1080
CTCAGTTCGG TGTAGGTCGT TCGCTCCAAG CTGGGCTGTG TGCACGAACC CCCCCTTCAG 1140
CCCACCGCT GCGCCTTATC CGGTAACTAT CGTCTTGAGT CCAACCCGGT AAGACACGAC 1200
TTATCGCCAC TGGCAGCAGC CACTGGTAAC AGGATTAGCA GAGCGAGGTA TGTAGGCGGT 1260
GCTACAGAGT TCTTGAAGTG GTGGCCTAAC TACGGCTACA CTAGAAGGAC AGTATTTGGT 1320
ATCTGCGCTC TGCTGAAGCC AGTTACCTTC GGAAAAAGAG TTGGTAGCTC TTGATCCGGC 1380
AAACAAACCA CCGCTGGTAG CGGTGGTTTT TTTGTTTGCA AGCAGCAGAT TACGCGCAGA 1440

```

AAAAAAGGAT CTCAAGAAGA TCCTTTGATC TTTTCTACGG GGTCTGACGC TCAGTGGAAC 1500
GAAAACTCAC GTTAAGGGAT TTTGGTCATG AGATTATCAA AAAGGATCTT CACCTAGATC 1560
CTTTTAAATT AAAAATGAAG TTTTAAATCA ATCTAAAGTA TATATGAGTA AACTTGGTCT 1620
GACAGTTACC AATGCTTAAT CAGTGAGGCA CCTATCTCAG CGATCTGTCT ATTTTCGTTCA 1680
TCCATAGTTG CCTGACTCCC CGTCGTGTAG ATAACTACGA TACGGGAGGG CTTACCATCT 1740
GGCCCCAGTG CTGCAATGAT ACCGCGAGAC CCACGCTCAC CGGCTCCAGA TTTATCAGCA 1800
ATAAACCAGC CAGCCGGAAG GGCCGAGCGC AGAAGTGGTC CTGCAACTTT ATCCGCCTCC 1860
ATCCAGTCTA TTAATTGTTG CCGGAAGCT AGAGTAAGTA GTTCGCCAGT TAATAGTTTG 1920
CGCAACGTTG TTGCCATTGC TACAGGCATC GTGGTGTAC GCTCGTCGTT TGGTATGGCT 1980
TCATTAGCT CCGGTTCCCA ACGATCAAGG CGAGTTACAT GATCCCCCAT GTTGTGCAAA 2040
AAAGCGGTTA GTCCTTCGG TCCTCCGATC GTTGTGAGAA GTAAGTTGGC CGCAGTGTTA 2100
TCACTCATGG TTATGGCAGC ACTGCATAAT TCTCTTACTG TCATGCCATC CGTAAGATGC 2160
TTTTCTGTGA CTGGTGAGTA CTCAACCAAG TCATTCTGAG AATAGTGTAT GCGGCGACCG 2220
AGTTGCTCTT GCCCGGCGTC AATACGGGAT AATACCGCGC CACATAGCAG AACTTTAAAA 2280
GTGCTCATCA TTGGAAAACG TTCTTCGGGG CGAAAACTCT CAAGGATCTT ACCGCTGTTG 2340
AGATCCAGTT CGATGTAACC CACTCGTGCA CCCAACTGAT CTTCAGCATC TTTTACTTTC 2400
ACCAGCGTTT CTGGGTGAGC AAAAACAGGA AGGCAAAATG CCGCAAAAAA GGAATAAGG 2460
GCGACACGGA AATGTTGAAT ACTCATACTC TTCCTTTTTC AATATTATTG AAGCATTAT 2520
CAGGGTTATT GTCTCATGAG CGGATACATA TTTGAATGTA TTTAGAAAAA TAAACAAATA 2580
GGGGTTCCGC GCACATTTCC CCGAAAAGTG CCACCTGACG TCTAAGAAAC CATTATTATC 2640
ATGACATTAA CCTATAAAAA TAGGCGTATC ACGAGGCCCT TTCGTC 2686

Composición del iniciador 24 mer: **cgccagggttttccagtcacgac**

- Contenido de G-C = 62.50%

ANEXO 4. PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DEL PLÁSMIDO pUC 18 A MEDIANA ESCALA, ADAPTADO DE QUIAGEN (1997)

A. SEMBRADO DE LA BACTERIA TRANSFORMADA

- Se usa la la bacteria *E. coli* cepa E010.
- Preparar un preinóculo repicando la bacteria de una placa petri (con agar LB + Ampicilina) en 5 mL de Caldo LB y 5 μ L de Ampicilina (100 mg/ μ l) e incubar a 37 °C/16-18 h. en constante agitación, preferible con el tubo levemente inclinado.
- En un tubo de 50 ml agregar 15 ml de Caldo LB y 20 μ L de Ampicilina.
- Agregar el preinóculo en el tubo, mezclar levemente e incubar a 37 °C/16-18 h. en constante agitación, preferible con el tubo levemente inclinado.
- Repicar la bacteria en una nueva placa petri con agar LB + Ampicilina e incubar a 37 °C/24 h.

B. EXTRACCIÓN

- Mezclar uniformemente el cultivo bacteriano y repartir 1 ml en tubos eppendorf esterilizados de 2 ml.
- Centrifugar a 14 000 rpm/10 min.
- Previamente mantener el buffer de resuspensión o solución P₁ (Tris-HCl 50 mM, pH 8.0; EDTA 10 mM) a temperatura ambiente.
- Mezclar la solución P₁ con RNAsa (10 mg/ml) en las siguientes proporciones:

Medio de Cultivo (ml)	Solución P ₁ (ml)	RNAsa (μ l)
1.0	0.3	1.0
5.0	1.5	5.0
10.0	3.0	10.0
15.0	4.5	15.0
20.0	6.0	20.0
30.0	9.0	30.0
40.0	12.0	40.0

- Eliminar el sobrenadante suavemente y recuperar el pellet (células bacterianas). Recentrifugar el sobrenadante si es necesario.
- Agregar 0.3 ml de la mezcla de P₁ con RNAsa por cada 1 ml del caldo de cultivo y resuspender hasta disolver el pellet.
- Previamente entibiar el buffer de lisis o solución P₂ (NaOH 200 mM, SDS 1%) a 37 °C.
- Agregar 0,3 ml de solución P₂ y mezclar muy suavemente
- Incubar por espacio de 5 minutos exactos a temperatura ambiente.
- Previamente enfriar el buffer de neutralización o solución P₃ (Acetato de Potasio 3.0 M, pH 5.5) a –20 °C.
- Agregar 0,3 ml de solución P₃ a cada tubo y mezclar inmediatamente. Incubar en hielo por 5 minutos.
- Se debe esperar que el contenido presente una consistencia cremosa.
- Centrifugar a 14 000 rpm/30 min.
- Recuperar 500-600 µl del sobrenadante en tubos eppendorf esterilizados de 2 ml y eliminar el pellet (restos celulares). Recentrifugar el sobrenadante si es necesario.
- Agregar Isopropanol (a temperatura ambiente) en una proporción de 0.7 respecto al volumen de lo recuperado en el paso anterior.
- Agitar levemente hasta homogenizar.
- Incubar a –20 °C por 30'
- Centrifugar a 14 000 rpm/30 min.
- Eliminar el sobrenadante y con mucho cuidado recuperar el pellet (pequeño y semitransparente).
- Secar por 5 minutos en el nivel Medium del Speed Vac.
- Lavar con 1 ml de Alcohol al 70 % (a temperatura ambiente)
- Centrifugar a 14 000 rpm/20 min.
- Secar por 5 minutos o en el nivel Medium del liofilizador Speed Vac.
- Resuspender el pellet obtenido en agua libre de nucleasas. (40 µl en caso de pellet grande y 20 µl en caso de pellet pequeño)

ANEXO 5. ESTIMACIÓN DEL TAMAÑO DE LOS ALELOS SSR POR MEDIO DEL SECUENCIAMIENTO DE PARTE DEL PLÁSMIDO pUC 18

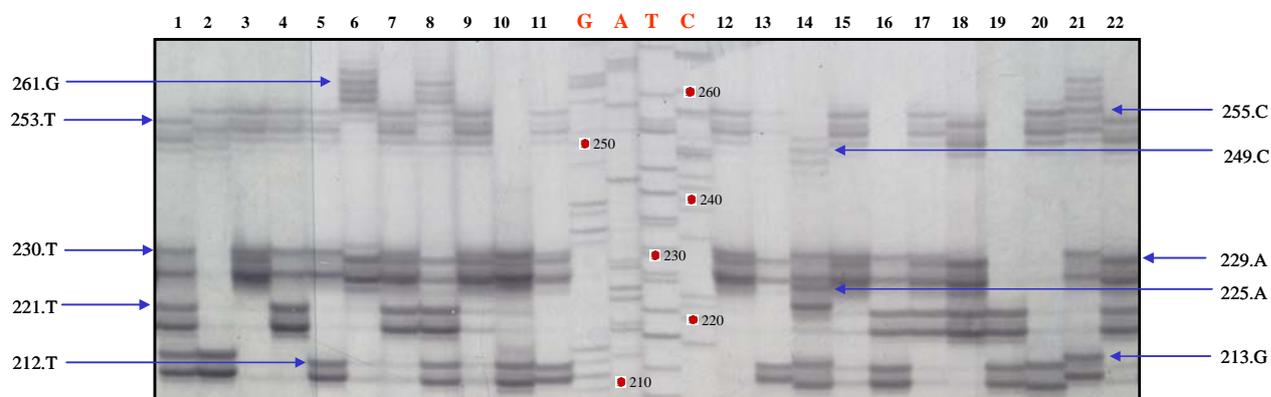


Figura 6. Polimorfismo del iniciador STM1052 (S084), revelado en gel de poliacrilamida al 6%. Se muestra parte del secuenciamiento del plásmido pUC 18 (GATC).

Tabla 10. Registro de alelos encontrados al amplificar el iniciador STM1052 (S084) en un grupo de papas nativas de la comunidad de Chahuaytire y de repatriadas por el CIP.

STM1052	700513	700832	706003	704501	701761	704546	CHA 3a	CHA 89	CHA 51a	CHA 88	CHA 115	CHA 51	CHA 3	CHA 116	CHA 69	CHA 115a	CHA 34	CHA 88a	CHA 69a	CHA 83a	CHA 173	CHA 89a
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
S084.261.G	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
S084.255.C	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0
S084.253.T	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
S084.249.C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
S084.230.T	1	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0
S084.229.A	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1
S084.225.A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
S084.221.T	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1
S084.213.G	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
S084.212.T	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0

ANEXO 6. FENOTIPO MOLECULAR DE LOS 10 LOCI SSR EVALUADOS EN GELES DE POLIACRILAMIDA AL 6%

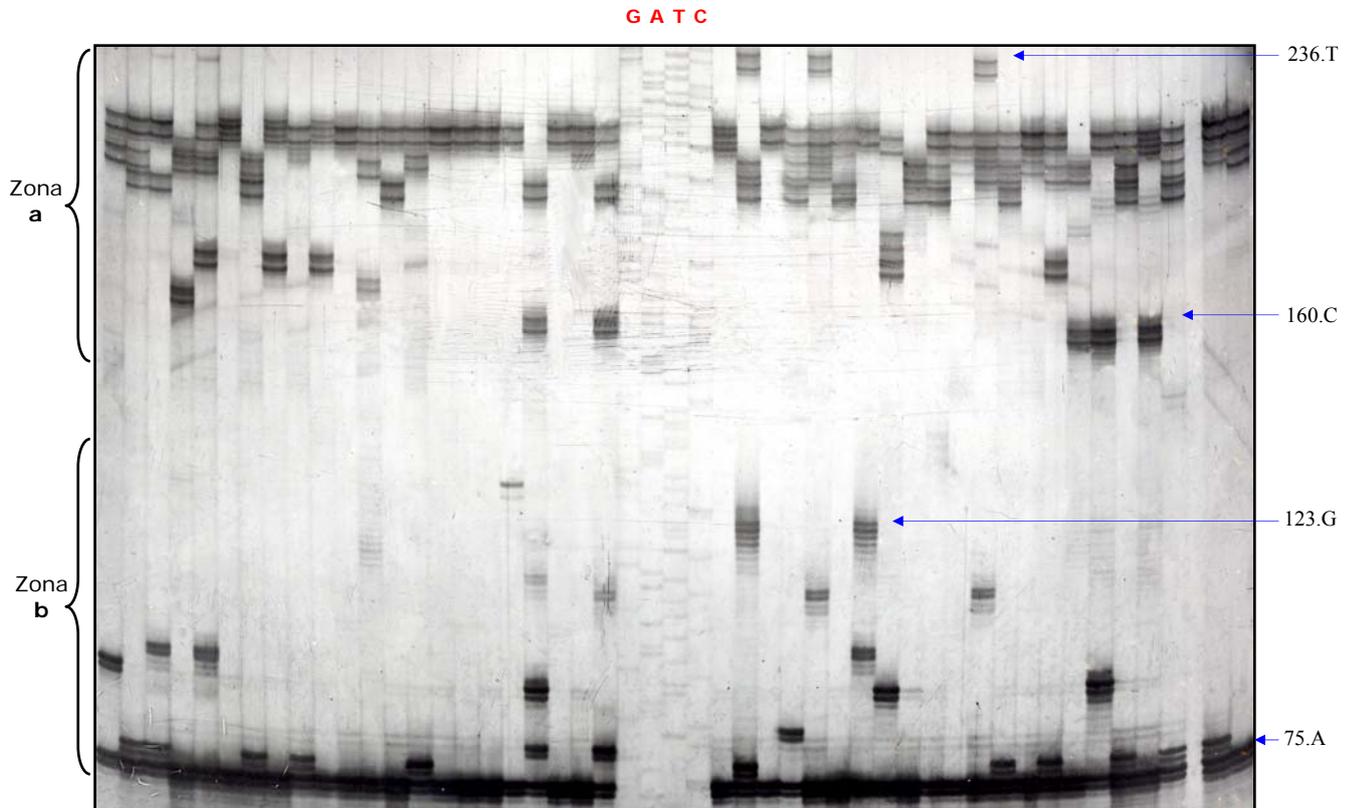


Figura 7. Polimorfismo hallado en el locus SSR STM0019a (Zona a) y STM0019b (Zona b), mostrando parte del secuenciamiento del plásmido pUC 18 (GATC) y el rango de los fragmentos registrados.

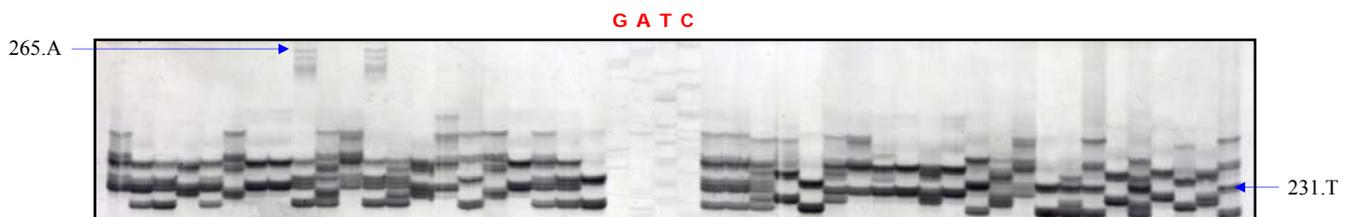


Figura 8. Polimorfismo hallado en el locus SSR STPoAc58 (S029), mostrando parte del secuenciamiento del plásmido pUC 18 (GATC) y el rango de los fragmentos registrados.

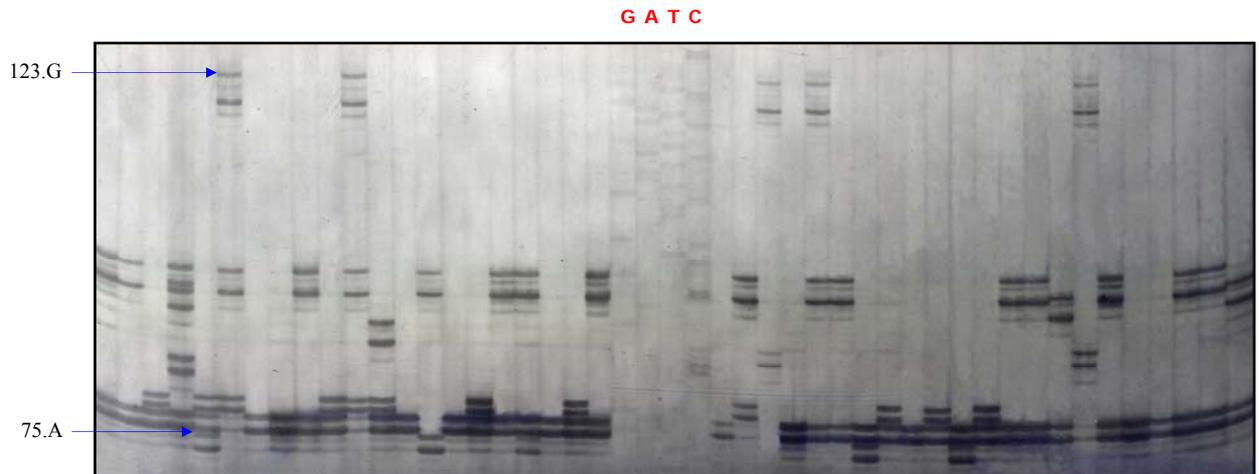


Figura 9. Polimorfismo hallado en el locus SSR STM0037 (S042), mostrando parte del secuenciamiento del plásmido pUC 18 (GATC) y el rango de los fragmentos registrados.

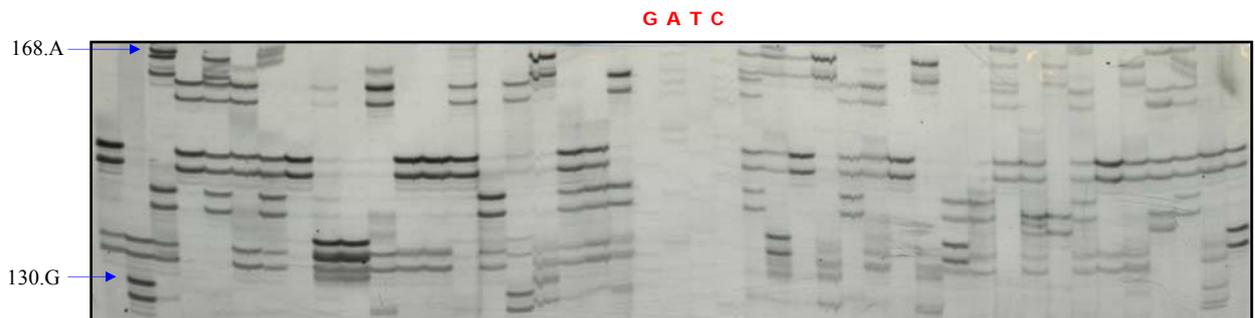


Figura 10. Polimorfismo hallado en el locus SSR STM0030 (S047), mostrando parte del secuenciamiento del plásmido pUC 18 (GATC) y el rango de los fragmentos registrados.



Figura 11. Polimorfismo hallado en el locus SSR STM1104 (S081), mostrando parte del secuenciamiento del plásmido pUC 18 (GATC) y el rango de los fragmentos registrados.

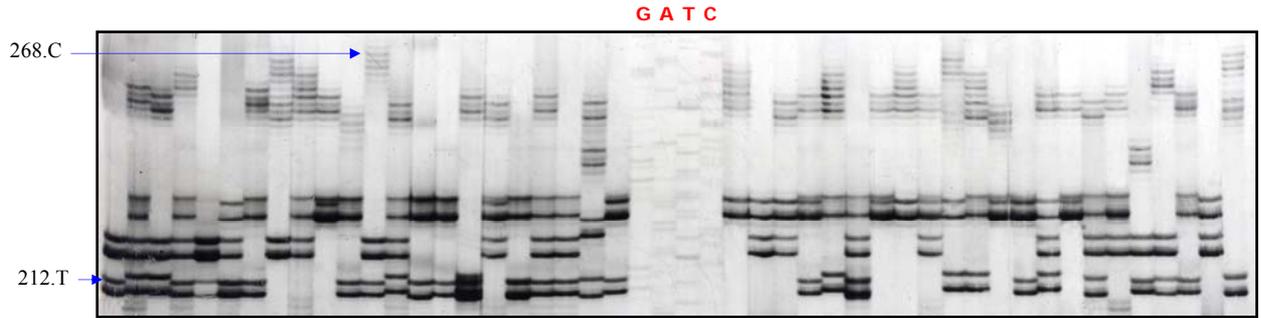


Figura 12. Polimorfismo hallado en el locus SSR STM1052 (S084), mostrando parte del secuenciamiento del plásmido pUC 18 (GATC) y el rango de los fragmentos registrados.

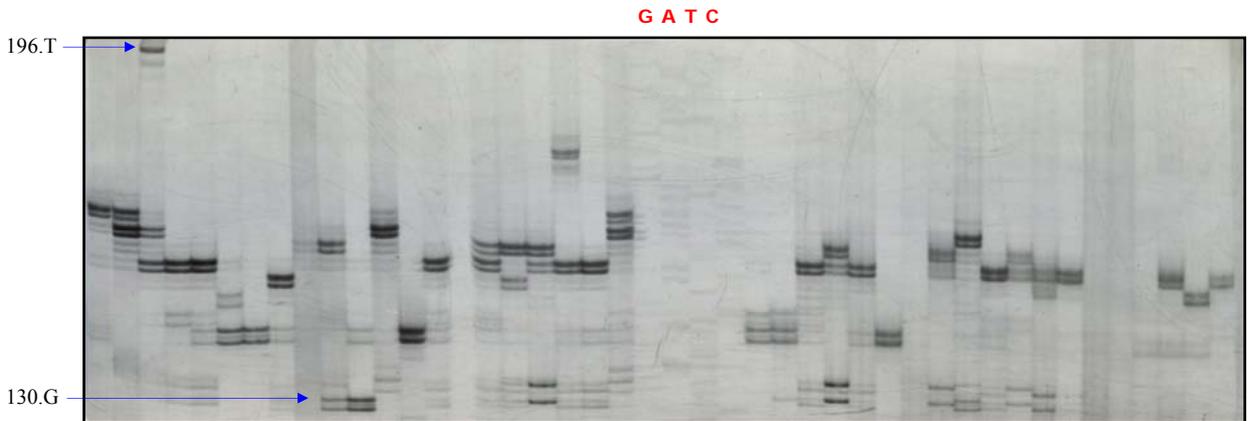


Figura 13. Polimorfismo hallado en el locus SSR STM1106 (S101), mostrando parte del secuenciamiento del plásmido pUC 18 (GATC) y el rango de los fragmentos registrados.

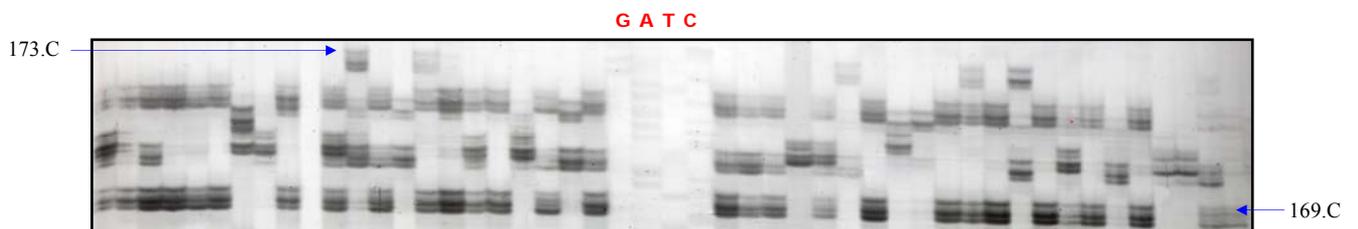


Figura 14. Polimorfismo hallado en el locus SSR STM2013 (S104), mostrando parte del secuenciamiento del plásmido pUC 18 (GATC) y el rango de los fragmentos registrados.



Figura 15. Polimorfismo hallado en el locus SSR STM2022 (S106), mostrando parte del secuenciamiento del plásmido pUC 18 (GATC) y el rango de los fragmentos registrados.

ANEXO 7. PREPARACIÓN DE REACTIVOS

A. SOLUCIONES PARA EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO

1. EDTA 0.5M pH 8.0

Reactivos	Cantidad
EDTA	186.1 g
Hidróxido de Sodio (NaOH)	100 pastillas aprox.
H₂O(d) c.s.p.	1 L

Se empieza a disolver en 800 ml. de H₂O(d) con las pastillas de NaOH (9.5 g aprox.), agregar EDTA lentamente y llevar a pH 8.0. Enrazar a 1 L., volver a medir el pH. Esterilizar en autoclave.

2. Tris-HCl 1M pH 8.0

Tris Base* (g)	Disolver con H ₂ O(d) (ml)	Volumen final
121.1 g	800.0	1 L
96.8 g	650.0	800.0 ml
60.5 g	400.0	500.0 ml

Luego de enrazar al volumen deseado se vuelve a medir el pH y se esteriliza en autoclave. *Sinónimos: Trizma base, Tris (hydroxymethyl) aminomethane.

3. CTAB Buffer de Extracción 10% (CTAB 10X)

Reactivos	[Final]		
Cloruro de Sodio (NaCl) 1M	0.7 M	2.05 g.	4.09 g
EDTA 0.5 M pH 8.0	20 mM	2.0 ml	4.0 ml
Tris-HCl 1M pH 8.0	100 mM	5.0 ml	10.0 ml
CTAB	10.0%	5.0 g	10.0 g
H₂O(d)	-	50.0 ml	100.0 ml

Iniciar la preparación de la solución con el 50% de H₂O(d) del volumen final deseado. El CTAB se agrega cuando la solución está caliente (80 °C) y luego de haber agregado todos los demás componentes. Agregar los componentes lentamente para evitar que se formen grumos. Evitar que la solución alcance punto de ebullición. Esterilizar en autoclave.

4. CTAB Buffer de Extracción 2% (CTAB 2X) para extracción a pequeña escala

Reactivos	[Final]		
Cloruro de Sodio (NaCl) 1M	1.4 M	8.18 g	81.81 g
EDTA 0.5 M pH 8.0	20 mM	4.0 ml	40.0 ml
Tris-HCl 1M pH 8.0	100 mM	10.0 ml	100.0 ml
CTAB	2.0%	2.0 g	20.0 g
(PVP)	0.01	1.0 g	10.0 g
H₂O(d) c.s.p.	-	100.0 ml	1.0 L

El CTAB y el PVP se agregan lentamente para evitar que se formen grumos, cuando la solución está caliente y luego de haber agregado todos los componentes. Esperar que disuelva primero el CTAB y después adicionar el PVP. Evitar que la solución alcance punto de ebullición. Esterilizar en autoclave.

5. CTAB Buffer de Extracción 2% (CTAB 2X) para extracción a mediana escala

Reactivos	[Final]		
CTAB	2.0%	20.0 g	
Cloruro de Sodio (NaCl) 1M	1.4 M	81.82 g	
{NaCl 5M en solución}	{1.4 M}	{280.0 ml}	
EDTA 0.5 M pH 8.0	25 mM	50.0 ml	
Tris-HCl 1M pH 8.0	100 mM	100.0 ml	
H₂O(d) c.s.p.	-	1.0 L	

El CTAB se agrega cuando la solución está caliente y luego de haber agregado todos los demás componentes. Ir agregando de a pocos para evitar que se formen grumos. Evitar que la solución alcance punto de ebullición. Esterilizar en autoclave.

6. T₁₀E₁

Reactivos	[Final]		
Tris-HCl 1M pH 8.0	10 mM	4.0 ml	10.0 ml
EDTA 0.5 M pH 8.0	1 mM	0.8 ml	2.0 ml
H ₂ O(d) c.s.p.	-	400.0 ml	1.0 L

Esterilizar en autoclave.

B. PCR DE LOS MICROSATÉLITES

1. Tampón de Reacción 10X para SSR (Tampón BOB's)

Reactivos	[Final]		
Tris Base*	1 M	1.211 g	6.055 g
Sulfato de Amonio (NH ₄) ₂ SO ₄	200 mM	0.264 g	1.32 g
Cloruro de Magnesio MgCl ₂ ·6H ₂ O	25 mM	0.051 g	0.255 g
H₂O (d) c.s.p.	-	10.0 ml	50.0 ml

Llevar a pH 9.0 con Hidróxido de Sodio (NaOH) 1 N; si resulta con pH > 9.0, disminuir el pH con HCl concentrado. Dispensar en tubos Eppendorf de 2 ml y esterilizar en autoclave.

*Sinónimos: Trizma base, Tris(hydroxymethyl)aminomethane.

2. Tampón para la preparación de la ribonucleasa A (RNAsa)

Reactivos	[Final]	
Tris-HCl 1M pH 7.5	10 mM	50.0 µl
NaCl 5M	15 mM	15.0 µl
H₂O (d) c.s.p.	-	5.0 ml

Resuspender la enzima comercial (50 mg.) en el tampón y dispensar en 5 tubos Eppendorf equitativamente hasta alcanzar una concentración de 10 mg/ml.

3. Tampón de Almacenamiento (SB) de la polimerasa *Taq I*

Reactivos	[Final]	
Tris HCl 1M pH 7.9	50 mM	100.0 ml
KCl	50 mM	7.5 g
EDTA 0.5 M pH 8.0	0.1 mM	0.4 ml
DTT (Dithiothreitol)	1 mM	0.3 g
PMSF (Fenil metil sulfonilo)	0.5 mM	0.2 g
Glicerol	50.0%	1.0 L
H₂O (d) c.s.p.	-	2.0 L

Disolver el PMSF en DMS (Dimethyl Sulfide) antes de usar.

C. ELECTROFORESIS EN GELES DE AGAROSA Y POLIACRILAMIDA

4. TBE 10X

Reactivos	[Final]			
Tris Base*	890 mM	108.0 g	216.0 g	432.0 g
Acido Bórico	890 mM	55.0 g	110.0 g	220.0 g
EDTA 0.5 M pH 8.0	20 mM	40.0 ml	80.0 ml	160.0 g
H₂O (d) c.s.p.	-	1.0 L	2.0 L	4.0 L

Esterilizar en autoclave.

*Sinónimos: Trizma base, Tris(hydroxymethyl)aminomethane.

5. Tampón de carga para corrida en agarosa (SALB 10X)

Reactivos	[Final] (10X)		
Azul de bromofenol	0.15% (p/V)	75.0 mg	150.0 mg
Xilen cianol	0.15% (p/V)	75.0 mg	150.0 mg
Naranja G	0.20% (p/V)	100.0 mg	200.0 mg
Sucrosa	60.0% (p/V)	30.0 g	60.0 g
TBE 10X	0.5X	2.5 ml	5.0 ml
Agua MiliQ c.s.p.	-	50.0 ml	100.0 ml

Iniciar la dilución de los colorantes con 10 ml de H₂O (d) Milli Q.

6. Geles de Agarosa al 1%

Reactivos	Molde chico	Molde mediano	Molde grande
TBE 1X	30.0 ml	60.0 ml	250.0 ml
Agarosa	0.3 g	0.6 g	2.5 g
Bromuro de etidio[10 mg/ml]	0.3 µl	0.6 µl	2.5 µl

Se corre con Buffer TBE 1X (tanque horizontal) en volúmenes apropiados

7. Solución adherente (Bind)

Reactivos	Cantidad
Etanol 96°	1.0 ml
Bind silano	7.0 µl
Ácido acético	7.0 µl

8. Solución repelente (Repel)

Reactivos	Cantidad
Etanol 96°	1.0 ml
SIGMACOTE®	200.0 µl

9. Colorante de carga para geles de poliacrilamida (Dye stock)

Reactivos	[Final]	
Xilen cianol	50.0 mg	2.5 g
Azul de bromofenol	50.0 mg	2.5 g
H ₂ O (d) Milli Q c.s.p.	-	50.0 ml

10. Tampón de carga para geles de poliacrilamida

Reactivos	Cantidad
Formamida	48.0 ml
EDTA 0.2 M	2.5 ml
Dye - stock	500.0 µl

El volumen final supera levemente los 50.0 ml. Preparar en tubos cónicos de 50 ml. y dispensarlos equitativamente en tubos de 2 ml.

11. Solución Stock para geles de poliacrilamida al 6% (premezcla)

Reactivos	[Final]		
TBE 10X	50.0%	50.0 ml	200.0 ml
Bis-acrilamida	3.0%	3.0 g	12.0 g
Acrilamida	60.0%	60.0 g	240.0 g
Urea	7 M	420.0 g	1680.0 g
H ₂ O (d) Milli Q c.s.p	-	1.0 L	4.0 L

Iniciar la preparación del stock con 60% del volumen final de H₂O(d) Milli Q. Agregar los componentes en el orden indicado.

12. Gel de poliacrilamida al 6%

Reactivos	[Final]
Solución stock de poliacrilamida 6%	60.0 ml
TEMED	33.0 μ l
Persulfato de amonio al 10%	330.0 ml

13. Marcador Fago Lambda (λ) cortado con *Pst* I

Reactivos	[Final]	
NFW	-	11.27 μ l
Buffer 10X React 2	1 X	20.0 μ l
<i>Pst</i> I (10 U/ μ l)	100 U (2U / μ g de λ)	10.0 μ l
DNA del fago Lambda (0.315 μ g/ μ l)	50 μ g	158.73 μ l
Volumen final	-	200.0 μ l

Incubar 3 horas a 37 °C, agregar 250.0 μ l de NFW y repartir en 5 tubos Eppendorf equitativamente. Adicionar 50 μ l de SALB 10 X (azul de carga para agarosa) antes de usar y homogenizar.

D. TINCIÓN CON NITRATO DE PLATA

1. Solución de fijación/ detención

Reactivos	[Final]	
Ácido acético glacial 100%	10.0 %	100.0 ml
H ₂ O (d) c.s.p.	-	1.0 L

Preparar la solución en cámara de flujo, usando mascarilla y guantes. Mantener la solución a 10 °C.

2. Solución de tinción

Reactivos	[Final]	
Nitrato de plata	1.0 %	1.0 g
Formaldehído comercial (37%)	0.037%	1.0 ml
H ₂ O (d) c.s.p.	-	1.0 L

Preparar la solución en envase oscuro de vidrio y mantenerla a 10 °C.

3. Solución reveladora

Reactivos	
Carbonato de Sodio anhidro (Na_2CO_3)	18.0 g
H₂O (d) c.s.p.	600.0 ml

Mantener la solución en congelamiento. Descongelar momentos antes de usarla y adicionar 13.6 μl de tiosulfato de sodio y 900 μl de formaldehído comercial (37%)