

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
LA MOLINA**

FACULTAD DE CIENCIAS



**“ESTUDIO DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA DEL LOCHE DE
LAMBAYEQUE (*Cucurbita moschata* Duchesne ex Lam.) MEDIANTE
MARCADORES MOLECULARES MICROSATÉLITES”**

Presentada por:

KAROL KATHERINE CHAYÑA SANTA CRUZ

Tesis para Optar el Título Profesional de:

BIÓLOGO

Lima – Perú

2021

**La UNALM es la titular de los derechos patrimoniales de la presente investigación
(Art. 24. Reglamento de Propiedad Intelectual)**

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
LA MOLINA**

FACULTAD DE CIENCIAS

**“ESTUDIO DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA DEL LOCHE DE
LAMBAYEQUE (*Cucurbita moschata* Duchesne ex Lam.) MEDIANTE
MARCADORES MOLECULARES MICROSATÉLITES”**

Presentada por:

KAROL KATHERINE CHAYÑA SANTA CRUZ

Tesis para Optar el Título Profesional de:

BIÓLOGO

Sustentada y aprobada por el siguiente jurado:

Dra. Rosa Espejo Joya
PRESIDENTE

Ph. D. Jorge Jiménez Dávalos
MIEMBRO

Mg.Sc. Roberto Mansilla Samaniego
MIEMBRO

Mg.Sc. César López Bonilla
ASESOR

DEDICATORIA

A mis profesores, técnicos y compañeros de
laboratorio en la universidad, por sus
ánimos y apoyo constante.

AGRADECIMIENTOS

Expreso mi sincero agradecimiento a mi profesor Mg.Sc. César Fernando López Bonilla, Biólogo Cesar López Palomino, Ing. Joel Flores y a todos los miembros del IBT (Instituto de biotecnología de la Universidad Nacional Agraria La Molina) por su apoyo incondicional durante el desarrollo este trabajo.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	ix
ABSTRACT	x
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN DE LA LITERATURA	3
2.1 DESCRIPCIÓN MORFOLÓGICA DE <i>C. moschata</i>	3
2.2 ORIGEN, DISTRIBUCIÓN Y UTILIDAD <i>C. moschata</i> EN EL MUNDO	3
2.3 DIVERSIDAD GENÉTICA DE <i>C. moschata</i>	4
2.4 EL LOCHE DE LAMBAYEQUE	5
2.5 DESCRIPCIÓN MORFOLÓGICA DEL LOCHE DE LAMBAYEQUE	7
2.6 PROPAGACIÓN.....	9
2.7 FITOMEJORAMIENTO.....	9
2.8 LA EXTRACCION DEL ADN PARA ANÁLISIS MOLECULARES	10
2.9 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)	11
2.10 MARCADORES MOLECULARES	12
2.11 MARCADORES MICROSATÉLITES (SSR)	14
2.12 VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE LOS MARCADORES MICROSATÉLITES	15
2.13 MEDIDAS DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA.....	15
2.14 REVISIÓN DE ESTUDIOS MOLECULARES EN CUCÚRBITAS	17
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	20
3.1 MATERIALES.....	20
3.1.1 MUESTRAS VEGETALES.....	20
3.1.2 MATERIALES DE LABORATORIO.....	21
3.2 MÉTODOS.....	23
3.2.1 EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO.....	23
3.2.2 CUANTIFICACIÓN Y CALIDAD DEL ADN.....	25
3.2.3 AMPLIFICACIÓN CON MARCADORES MICROSATÉLITES	25

3.2.4 ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA	28
3.2.5 DETECCIÓN DE BANDAS.....	29
3.2.6 OBTENCIÓN DE DATOS	29
IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES	30
4.1 RESULTADOS DE LA EXTRACCIÓN DE ADN.....	30
4.2 COMPARACIÓN DE LOS PATRONES ALÉLICOS DEL LOCHE OBTENIDOS EN EL AÑO 2013 Y 2008.....	32
4.3 INTERPRETACIÓN DE LOS PATRONES ELECTROFORÉTICOS Y LA MATRIZ DE DATOS.....	38
4.4 ESTIMACIÓN DE PARÁMETROS GENÉTICOS POBLACIONALES CON MARCADORES MOLECULARES MICROSATÉLITES	41
4.4.1 ESTIMACIÓN DE LAS FRECUENCIAS ALÉLICAS EN LA POBLACIÓN DE LOCHE	41
4.4.3 ESTIMACIÓN DE LOS ESTADÍSTICOS DE DIVERSIDAD GENÉTICA	43
4.4.4 ESTIMACIÓN DE LOS ESTADÍSTICOS DE HETEROCIGOSIDAD. ...	46
4.4.5 ESTIMACIÓN DEL ÍNDICE DE FIJACIÓN DE WRIGHT.....	49
4.4 DISCUSIONES ADICIONALES	51
V. CONCLUSIONES.....	56
VI. RECOMENDACIONES	57
VII. BIBLIOGRAFÍA	58
VIII. ANEXOS	65

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Rendimientos del Loche en Lambayeque del año 2001 al 2008.	7
Tabla 2: Especificaciones de las muestras colectadas en el 2013.	21
Tabla 3: Características de algunos de los marcadores microsatélites desarrollados por de Gong et al (2008).	26
Tabla 4: Descripción de reactivos y las concentraciones usadas en la preparación de cada mix de reacción de PCR.....	27
Tabla 5: Cuantificación en ng/ul y pureza del ADN obtenido de las muestras colectadas en el año 2013.....	31
Tabla 6: Matriz de datos binarios de marcadores SSR con las muestras del año 2013.....	39
Tabla 7: Polimorfismo de las bandas obtenidas con 15 marcadores de Gong et al (2008)	40
Tabla 8: Frecuencias alélicas encontradas de los locus analizados en el año 2008.....	42
Tabla 9: Frecuencias alélicas encontradas de los locus analizados en el año 2013.....	42
Tabla 10: Frecuencias alélicas encontradas en la población conjunta de las muestras colectadas en el año 2008 y 2013.....	42
Tabla 11: Resumen de estadísticos de diversidad genética para todos los loci a nalizados en el año 2008	44
Tabla 12: Resumen de estadísticos de diversidad genética para todos los loci analizados en el año 2013	45
Tabla 13: Resumen de estadísticos de diversidad genética para los loci analizados tanto en el año 2008 como en el año 2013.....	45
Tabla 14: Estadísticos de heterocigosidad para todos los loci analizados en el año 2008.....	46
Tabla 15: Estadísticos de heterocigosidad para todos los loci analizados en el año 2013.....	47
Tabla 16: Estadísticos de heterocigosidad para todos los loci analizados en el año 2008 y 2013.....	48

Tabla 17: Índice de fijación de Wright de los locus analizados en el año 2008.....	50
Tabla 18: Índice de fijación de Wright de los locus analizados en el año 2013.....	50
Tabla 19: Frecuencias alélicas encontradas en la población conjunta de las muestras colectadas en el año 2008 y 2013.	50

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Mapa político de Lambayeque.....	6
Figura 2: Fruto de Loche en un campo agrícola. Obsérvese las crestas características.	8
Figura 3: Planta de Loche con flor masculina. Nótese que aún no presenta los granos de polen.	20
Figura 4: Gráfica del programa de amplificación touchdown usado.....	28
Figura 5. Patrón alélico de la muestra del año 2008 amplificada con el par CMTm103.....	33
Figura 6. Patrón alélico de la muestra del año 2013 amplificada con el par CMTm103.....	33
Figura 7. Patrón alélico de la muestra del año 2008 amplificada con el par CMTm186.....	33
Figura 8. Patrón alélico de la muestra del año 2013 amplificada con el par CMTm186.....	33
Figura 9. Patrón de alélico de muestra del año 2008 amplificada con el par CMTm42.....	34
Figura 10. Patrón alélico de la muestra del año 2013 amplificada con el par CMTm42.....	34
Figura 11. Patrón alélico de la muestra del año 2008 amplificada con el par CMTmC11.....	34
Figura 12. Patrón alélico de la muestra del año 2013 amplificada con el par CMTmC11.....	34
Figura 13. Patrón alélico de la muestra del año 2008 amplificada con el par CMTmC52.....	34
Figura 14. Patrón alélico de la muestra del año 2013 amplificadas con el par CMTmC52.....	34

Figura 15. Patrón alélico de la muestra del año 2008 amplificada con el par CMTmC3	35
Figura 16. Patrón alélico de la muestra del año 2013 amplificada con el par CMTmC3.....	35
Figura 17. Patrón alélico de la muestra del año 2008 amplificadas con el par CMTm229.....	35
Figura 18. Patrón alélico de la muestra del año 2013 amplificadas con el par CMTm229.....	35
Figura 19. Patrón alélico de la muestra del año 2008 amplificadas con el par CMTm39.....	36
Figura 20. Patrón alélico de la muestra del año 2013 amplificadas con el par CMTm39.....	36
Figura 21. Patrón alélico de la muestra del año 2008 amplificadas con el par CMTm165.....	36
Figura 22. Patrón alélico de la muestra del año 2013 amplificadas con el par CMTm165.....	36
Figura 23. Patrón alélico de la muestra del año 2008 amplificadas con el par CMTm243.....	37
Figura 24. Patrón alélico de la muestra del año 2013 amplificadas con el par CMTm243.....	37
Figura 25. Patrón alélico de la muestra del año 2008 amplificadas con el par CMTmC37. 37	
Figura 26. Patrón alélico de la muestra del año 2013 amplificadas con el par CMTmC37. 37	
Figura 27. Patrón alélico de la muestra del año 2008 amplificadas con el par CMTm211.37	
Figura 28. Patrón alélico de la muestra del año 2013 amplificadas con el par CMTm211.....	37

Figura 29. Patrón alélico de la muestra del año 2008 amplificadas con el par CMTm232.....	38
Figura 30. Patrón alélico de la muestra del año 2013 amplificadas con el par CMTm232.....	38
Figura 31. Patrón alélico de la muestra del año 2008 amplificadas con el par CMTm25.....	38
Figura 32. Patrón alélico de la muestra del año 2013 amplificadas con el par CMTm25.....	38

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1: BUFFER DE LISIS PARA EXTRACCION – CTAB (AppliChem)	66
Anexo 2: BUFFER TBE 10 X.....	66
Anexo 3: SOLUCIÓN ADHERENTE	66
Anexo 4: ENSAMBLAJE Y PREPARACIÓN DEL GEL DE POLIACRILAMIDA AL 6%	67
Anexo 5: TINCION CON NITRATO DE PLATA.....	68

RESUMEN

El Loche de Lambayeque es un producto emblemático del norte del Perú y de gran importancia para los agricultores lambayecanos. Para evaluar el estado de diversidad de este cultivar, se analizaron 23 muestras de hojas de Loche (*C. moschata*) colectadas en el año 2013 provenientes de tres diferentes distritos de Lambayeque: Eten, Illimo y Poma III. El procedimiento de extracción de ADN se realizó mediante un protocolo modificado con buffer CTAB establecido por Doyle y Doyle (1990). Se utilizaron cebadores o primers *ssr* desarrollados por Gong et al (2008) para el género *Cucurbita sp.* Se obtuvo una heterocigosidad esperada de Nei de 0.0357 y un índice de Shannon promedio de 0.0495 a diferencia del 0.0811 obtenido en el estudio de López et al (2014) con muestras colectadas en el año 2008. Finalmente se enumera una serie de posibles razones que expliquen la baja diversidad genética obtenida con marcadores microsatélites en el Loche de Lambayeque.

Palabras clave: Loche, Lambayeque, microsatélites, cucúrbitas.

ABSTRACT

Loche of Lambayeque is a Peruvian north's emblematic product and very important to Lambayeque's farmers. To evaluate the diversity state of this cultivar 23 leaf samples were collected from three different Lambayeque's districts: Eten, Illimo y Poma III. The DNA extraction followed a CTAB modified protocol from Doyle and Doyle (1990). Gong et al (2008)'s microsatellite primers for cucurbits were used. The h_e 's expected heterozygosity calculated was 0.0357 and the Shannon diversity index was 0.0495 versus 0.0811 from López et al (2014) analysis of samples collected on 2008. At last, the possible motives are discussed.

Keywords: Loche, Lambayeque, microsatellite, cucurbits.

I. INTRODUCCIÓN

El Loche de Lambayeque, es un producto emblemático de la comida norteña desde tiempos prehispánicos y gracias al “boom gastronómico” está siendo revalorado dentro y fuera del país. Este cultivo de carácter tradicional y de identidad lambayecana, ha sido conservado por los agricultores norteños con gran celo, resguardándolo de regiones vecinas, manteniendo sus cultivos de Loche por medio de selección y propagación de los mejores esquejes, para así conservar las características agronómicas que más les interesan: el rendimiento, tamaño y aroma de los frutos (PROPOMAC, 2012; Barboza, 2017).

Lamentablemente el cultivar, al igual que muchas hortalizas, es afectado por diversas plagas y enfermedades que disminuyen su capacidad de rendimiento afectando los ingresos de los agricultores y creando desmotivación en la producción (PROPOMAC, 2012). Adicionalmente, como muchos cultivos nativos, está siendo desplazado por cultivos industriales o de exportación (Ugás et al., 2006).

Se conoce que la diversidad genética de una especie es un reservorio de resistencia ambiental potencial, que protege contra pérdidas totales debidas a enfermedades, ataques de herbívoros, o variaciones imprevistas en las condiciones ambientales (Gliessman, 2002; Ferreira y Grattapaglia, 1998). En otros países, como Argentina o México, se han caracterizado detalladamente las variedades propias de *C. moschata*, implementando programas de mejoramiento y producción de híbridos con mayor rendimiento para abastecer sus mercados internos y externos (Lira y Montes, 1992; Edurne et al., 2013).

Para implementar un plan de mejoramiento adecuado, valorando la diversidad de un cultivo y usarlo para lograr un mayor rendimiento se debe caracterizar el cultivo, no sólo fenotípicamente (cómo se ha venido haciendo), sino también usar las herramientas moleculares disponibles, cómo una guía extra de ahorro de tiempo en comparación a otros métodos clásicos.

Por todo ello, es necesario conocer el estado actual de la diversidad genética del Loche de Lambayeque y compararlo con estudios anteriores, para verificar si hay baja o alta diversidad

y o si la variación es la misma, como primer paso para establecer las bases de la mejora genética y productiva del loche que beneficie a los agricultores lambayecanos.

El objetivo principal de este estudio fue evaluar el estado de la diversidad genética a nivel molecular de *Cucurbita moschata* Duchesne, cultivar Loche proveniente de Lambayeque – Perú, así como evaluar el estado del polimorfismo alélico en dos períodos de tiempo diferentes de cultivo y realizar un diagnóstico de la estructura genética poblacional y estima de parámetros correspondientes.

En el Peru, el Loche de Lambayeque ha sido señalado como un cultivo con poblaciones genéticamente homogéneas por Arbizu et al (2010) y López et al (2014), ambos estudios realizados en muestras colectadas en el año 2008, aunque el primero mencionado no muestra en detalle la metodología y los marcadores utilizados.

Es por ello, que con el fin de brindar mayor certeza sobre el estado de la estructura poblacional del Loche se ha evaluado una muestra colectada en el año 2013 mediante marcadores moleculares microsátélites, los que se caracterizan por brindar un alto contenido de información polimórfica. El presente estudio también incluye comparaciones con los resultados obtenidos por López et al (2014); por lo que se logra analizar la diversidad en una misma población en dos años diferentes. Finalmente se procede a analizar las posibles causas que han llevado a un cultivo de origen precolombino como el Loche al estado de diversidad genética en el que se encuentra.

II. REVISIÓN DE LA LITERATURA

2.1 DESCRIPCIÓN MORFOLÓGICA DE *C. moschata*

C. moschata, como especie, es una planta rastrera o trepadora, herbácea, anual, y monoica. Tanto la parte vegetativa como las flores tienen pubescencia suave y densa, con tricomas largos y cortos. Tiene raíces fibrosas y tallos rígidos con zarcillos ramificados, habiendo un tallo principal largo del cual salen diversas ramas laterales. Hojas grandes, ovado-cordadas a suborbiculares, los lóbulos pueden ser ovados o triangulares, con el ápice obtuso, cortamente apiculado, y los márgenes serrado-denticulados (Lira y Montes, 1992; Ugás et al, 2006).

Las flores son unisexuales, pentámeras, solitarias, y axilares. La flor masculina tiene pedicelos de 16-18 cm; cáliz campanulado a pateriforme, expandido o foliáceo hacia el ápice. Las flores femeninas, en cambio, tienen pedicelos gruesos de tres a ocho centímetros de largo; ovario globoso a cónico, con tres estigmas lobados. (Lira y Montes, 1992; Ugás et al., 2006).

Los frutos son tipo pepónide, de tamaño muy variable y formas diversas conservando las del ovario, a veces con engrosamiento basal. El epicarpio puede ser suave o liso o con costillas redondeadas, raramente verrugosas o granulosas, coloración variable, de verde claro a verde oscuro, uniforme o con manchas cremas, pardo claras a oscuras. La pulpa es anaranjada clara o brillante a verdosa, de ligera a muy dulce, suave y generalmente no fibrosa (Lira y Montes, 1992; Ceron et al 2010). Las semillas suelen ser elípticas, con margen definido, de color amarillo o café (Zaccari, 2005).

2.2 ORIGEN, DISTRIBUCIÓN Y UTILIDAD *C. moschata* EN EL MUNDO

C. moschata pertenece a la familia *Cucurbitaceae* del orden Cucurbitales. Tiene diversas variedades y nombres a lo largo del Centro y Sur América; se le llama calabaza en México, aunque también es conocida como Auyama en el mismo país y de Panamá a Venezuela; Ayote de Guatemala a Costa Rica y Loche en Ecuador y Perú (PROPOMAC, 2012). Sus flores (en algunas regiones del Mediterráneo), tallos jóvenes, frutos tiernos y fruto maduros

son consumidos como verdura y como forraje. Las semillas también son comestibles y presentan altos contenidos de aceites y proteínas (Lira y Montes, 1992). Las calabazas, como se les llaman los frutos del género, poseen valores aceptables de magnesio y hierro, son bajos de calorías y además las calabazas de pulpa naranja, como el Loche, son ricas en carotenos (Valdemar, 2006).

Los restos arqueológicos más antiguos de la especie fueron encontrados en el noroeste de México (Cuevas de Ocampo, Tamaulipas, que datan de 4,900-3,500 a. C.). También se sabe de restos en el norte de Belice, en Tikal, Guatemala (2,000 a.C.-850 d. C.) y en Huaca Prieta, Perú (3,000 a. C.) (PROPOMAC, 2012; Lira, 1995; Whitaker y Bemis, 1975). La distribución geográfica de los restos arqueológicos conocidos de *C. moschata* indican que esta especie se cultiva desde hace más de 5 000-6 000 años. Su difusión hacia otros países, tanto dentro de América Latina como fuera del continente, fue seguramente muy temprana, así lo indica la existencia de la variedad llamada “*seminole pumpkin*”, cultivada desde tiempos precolombinos por grupos indígenas de Florida, Estados Unidos, y también su presencia en ilustraciones botánicas del siglo XVII, la especie se llegó a cultivar en India, Java, Angola y Japón. (Lira y Montes, 1992).

2.3 DIVERSIDAD GENÉTICA DE *C. moschata*

El género *Cucurbita* es considerado uno de los más variables en morfología en el reino vegetal (Bisognin, 2002). El número básico de cromosomas (x) de todas las especies del género constantemente es 20, su número 2n es igual a 40. Los perfiles de isoenzimas obtenidos en el género, sugieren que estas especies son de origen aloploiploide, es decir, que presentan más de un tipo de genoma a causa de la hibridación de dos o más especies (Singh, 1979; Bisognin, 2002).

Entre las especies cultivadas, *C. moschata* es la más variable y probablemente la más cercana a los ancestros del género, ya que tiene una alta compatibilidad interespecífica (Bisognin 2002). Esta especie se cultiva en una amplia gama de altitudes, con variedades de ciclos de vida de diferente duración, y variedades locales con características agronómicas sobresalientes, existiendo una notable diversidad morfológica de sus semillas y frutos (colores, formas, grosores y durabilidad de la cáscara del fruto) (Lira y Montes, 1992).

En un estudio de diversidad genética en cuatro especies mexicanas cultivables de calabaza: *C. argyrosperma*, *C. pepo*, *C. moschata* y *C. ficifolia*, usando marcadores RAPDs, encontraron que la especie con mayor polimorfismo genético de las cuatro fue *C. moschata*

(aunque en las cuatro se encontró poca diversidad genética interna). Asimismo, se resaltó que, a pesar de ello, la diversidad encontrada era baja, y es posible que las especies domesticadas presenten algún grado de aislamiento reproductivo provocado por factores geográficos, genéticos, fisiológicos, morfológicos o culturales (Cerón et al., 2010).

2.4 EL LOCHE DE LAMBAYEQUE

El Loche de Lambayeque (*Cucurbita moschata* Duchesne) (Díaz, 1957; Ugás et al., 2000; Ugás et al., 2006) es uno de los insumos principales de la gastronomía tradicional de la región de Lambayeque. Se usa en pequeñas cantidades para dar sabor a postres, sopas y platos típicos del norte del Perú como el famoso seco de cabrito, arroz con pato, el pato arverjado, la sopa de cholo o el espesado, entre otros (Ugás et al., 2006; PROPOMAC, 2012; Díaz, 1957; Vasquez 2016). Este cultivar ha sido confirmado por sus características morfológicas como *Cucurbita moschata* Duch. (Díaz, 1957; Ugás et al., 2000; Ugás et al., 2006). Pero para los lambayecanos no solo es parte de la comida tradicional, el Loche es también parte de su identidad cultural, principalmente por su historia relacionada a la cultura moche, donde tiene importancia religiosa conectada a mitos sobre fertilidad (Cairati, 2015: 125; Barboza, 2017).

En consecuencia, en el 2010, el Loche de Lambayeque fue declarado producto agrícola emblemático de la región Lambayeque, con su denominación de origen correspondiente a cargo de INDECOPI, gracias a una iniciativa conjunta entre el Gobierno Regional de Lambayeque, el Museo Nacional Sicán / Unidad Ejecutora Naymlap-Lambayeque del Ministerio de Cultura y el Instituto de Biotecnología de la Universidad Agraria La Molina (PROPOMAC, 2012).

El Loche es cultivado casi exclusivamente en los valles del norte del Perú en los departamentos de Lambayeque, Piura, y la Libertad (Ugás et al., 2006). Los productores de Lambayeque están dentro de los distritos de Illimo, Pítipo, Túcume y Cayanca; en la provincia de Chiclayo están en los distritos de Reque y Monsefú; mientras que en la provincia de Ferreñafe están en el distrito de Pítipo (PROPOMAC, 2012; Ugás et al., 2006). Según Moreano (2013), que realizó una tesis sobre descripción agronómica del Loche, los distritos que concentran el mayor número de agricultores de esta hortaliza son Illimo y Pítipo. Todos los distritos mencionados anteriormente se pueden observar en el mapa político de Lambayeque, en la Figura 1.



Figura 1. Mapa político de Lambayeque

Además de ser una parte importante del acervo cultural de esta región; y a pesar del poco apoyo a los cultivos nativos, este cultivar puede llegar a tener un amplio rendimiento bajo un buen manejo agronómico. El P.E. Chavimochic (2009), como parte de su Programa de reconversión agrícola, apoyó el cultivo de zapallo Loche en una parcela demostrativa de Huancaquito Bajo (Virú), aduciendo que en esta zona se puede sembrar y cosechar zapallo Loche todo el año, a diferencia de la región de Lambayeque. Lograron buenos resultados de rendimiento sembrando en 950 metros cuadrados, obteniendo 250 zapallos Loches, que

proyectados estimaban un rendimiento mínimo de 2650 kilogramos por hectárea e ingresos de S/. 21.200 (veintiún mil doscientos soles) por hectárea (si se pagaba a ocho soles el kilogramo), cifras que superaban a otros cultivos de la zona.

Mientras, en Lambayeque, este rendimiento se supera largamente según la Dirección Regional de Agricultura de Lambayeque partiendo de la información que se encuentra resumida en la Tabla 1 correspondiente a los años del 2001 a 2008, perteneciente a la publicación de PROPOMAC (2012), donde se indica que el rendimiento del Loche puede ir desde 5000 a 11700 kilogramos por hectárea y una producción de toneladas anuales de 148 a 625. En esta tabla también se observa que tanto los rendimientos, la producción y los productores varían ampliamente sin poder definirse si hay una tendencia clara al incremento o no de los mismos.

Tabla 1: Rendimientos del Loche en Lambayeque del año 2001 al 2008.

VARIABLES	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008
COSECHAS (ha)	24	72	35	28	51	56	25	55
RENDIMIENTO (Kg/ha)	9042	10125	7571	5286	11745	11161	9400	5000
PRODUCCION (t)	217	729	265	148	599	625	235	275
NUMERO DE PRODUCTORES	17	48	23	21	41	41	17	42

FUENTE: PROPOMAC (2012).

“Kg” es kilogramos, “ha” es hectáreas, “t” es toneladas.

2.5 DESCRIPCIÓN MORFOLÓGICA DEL LOCHE DE LAMBAYEQUE

La planta de Loche tiene flores amarillas, unisexuales, solitarias, actinomorfas y de perianto pentámero (Isamar, 2017) con partes más pequeñas que muchos otros cultivares de *C. moschata* según Ugás et al. (2006). El fruto inicia verde externamente para tornarse verde oscuro, con crestas verrugosas longitudinales paralelas, más oscuras que la cáscara, que no lignifica, lo cual es raro para los frutos con crestas del género. La pulpa es amarilla anaranjada con un contenido relativo de materia seca alto, un aroma y sabor característicos, además de ser rico en carbohidratos, fibra y capacidad antioxidante (la cual es mayor cuando se sancocha) (López et al, 2014; Henderson y Yapias, 2014; Ugás et al., 2000).

El fruto puede pesar de medio a dos kilogramos o incluso mucho más, hasta seis kilogramos, dividiéndose en categorías según su peso, y en promedio miden de 20 a 30 cm de largo. Las semillas son de color claro pardo, con los bordes oscuros (Ugás et al., 2006; PROPOMAC, 2012). En la Figura 2 se puede visualizar un fruto de Loche de tamaño y forma promedio creciendo al ras del suelo tal como se encuentra en los campos de cultivo.



Figura 2. Fruto de Loche en un campo agrícola. Obsérvese las crestas características.

Asimismo, Bazo (2018) observó que este cultivar puede producir frutos apomicticos, es decir, frutos con semilla que se forman sin necesidad de polinización. Otra característica del cultivar es que presenta frutos con y sin semillas. Los frutos sin semillas son sólidos sin cavidad interna, mientras que los que llevan semillas tienen una cavidad pequeña con varias semillas de las cuales algunas faltan desarrollar según Ugás et al. (2006).

La siembra por esquejes es característica del Loche debido a que, de sembrarse a partir de semillas, los frutos no son considerados como Loches “verdaderos” para muchos pobladores lambayecanos, distinguiéndolos por su forma, tamaño, color y uso. En la actualidad, según Moreano (2013), la población de Lambayeque diferencia el Loche en términos de “Loche” (o Loche “verdadero”, “criollo”, etc) que es el característico fruto de un cultivo propagado por esquejes; el Loche de montaña (“de selva”, “serrano”, “de Bagua”), que es el fruto traído de la selva, y el “zapallo Loche” a todos los frutos de *C. moschata* propagados por semilla botánica que, según algunos agricultores, contienen características diferentes al “Loche”, al ser un fruto moteado y de color verde o amarillo opaco. Sin embargo, el mismo autor señala que estas definiciones no son claras ni precisas al diferenciar los productos en el mercado.

Existe una teoría entre los pobladores que cultivan Loche acerca de que se trata de un híbrido infértil y esa es la razón de su propagación por medio de esquejes. Sin embargo, la literatura describe flores perfectamente funcionales y semillas desarrolladas (Ugás et al., 2006; Bazo, 2018). De hecho, Bazo (2018) sembró unas 30 semillas como parte de las muestras para su investigación y no encontró mayor diferencia entre los frutos provenientes de esquejes con

los de semilla sexual, sin embargo, si encontró diferencia entre los frutos obtenidos por polinización y los frutos apomícticos.

2.6 PROPAGACIÓN

“El loche se siembra por esqueje, y en el caso de que se siembren las escasas semillas, los frutos no serán loches sino otro tipo de zapallo, desprovisto del característico aroma del loche y de su pulpa anaranjada. Los agricultores que se dedican al cultivo de loche utilizan las fases lunares como calendario de programación del cultivo: la tierra se prepara con guano de las islas en los días de “luna verde”, es decir luna naciente, para luego dedicarse a la siembra en los días de “luna madura”, es decir luna llena” (Cairati, 2015).

Según Rojas et al. (2004) la propagación por medio de esquejes es la escogida por los agricultores principalmente porque permitiría la conservación del fenotipo ideal para ellos (principalmente el aroma), evadir el efecto de las pocas semillas totalmente desarrolladas y acortar el ciclo reproductivo. Díaz (1975), realizó el análisis correspondiente en el cultivar, y concluyó que la siembra por esquejes es mucho más rentable por su bajo costo en mano de obra y de tiempo, además de mayores rendimientos, en comparación de la propagación usando semillas.

Existe un intercambio constante de estos esquejes entre los campesinos, aunque al mismo tiempo lo resguardan celosamente de las regiones vecinas (PROPOMAC, 2012; Ugás et al., 2006). Para evitar la propagación de enfermedades, las yemas pueden ser tratadas con pesticidas o hipoclorito, pero en caso de quedarse sin esquejes por esta u otras razones, los agricultores siembran las semillas como último recurso, mas no cosechan los frutos, más bien se seleccionan las mejores productoras para recuperar sus esquejes (PROPOMAC, 2012; Ugás et al., 2006).

2.7 FITOMEJORAMIENTO

Para una variedad de cultivo o cultivar, la diversidad genética es un reservorio de capacidades de respuesta a la variación ambiental potencial, protegiéndola contra pérdidas debidas a enfermedades, ataques de herbívoros, u otras variaciones imprevistas en las condiciones ambientales (Gliessman, 2002). El mejoramiento genético de las plantas ha sido practicado con éxito desde los inicios de la civilización gracias a la variabilidad (Ferreira y Grattapaglia, 1998).

Por ello, la diversidad genética es la materia prima para el mejoramiento genético y su pérdida puede restringir oportunidades para un futuro plan de mejoramiento. Al mismo tiempo, se debe tener en cuenta que la homogeneidad genética es más común a nivel de cultivares, esto debido a las exigencias del mercado que promueven la especialización (características determinadas) y los productos homogéneos (Gliessman, 2002). La contradicción entre presión de mercado y la necesidad de diversidad para sobrevivir hace resaltar la importancia de un buen plan de manejo y mejoramiento de los cultivares más importantes para la población.

Rojas (2004) recomienda que, en caso de implementarse el método de propagación vegetativa en un cultivar, se debe buscar y conservar constantemente clones élites con características deseables pero provenientes de diferentes ambientes, que permitan llevar la variabilidad genética de sus sitios de origen, siendo la caracterización y evaluación de estas colecciones, una de las mayores prioridades. En el mejoramiento de las especies de las cucurbitáceas se ha usado selección masal, genealógica y recurrente para aumentar la producción, calidad y resistencias a plagas y enfermedades. Ya que estas plantas son alogámas, la heterosis es un factor importante en su mejora genética (Valdemar, 2006).

Como ejemplo, se tiene el zapallo Anquito (*Cucurbita moschata* Duch.) de Argentina, cultivo en el cual se ha buscado mejorar el hábito de crecimiento, la resistencia a enfermedades (fúngicas, bacterianas y virales), la resistencia a plagas y el rendimiento; en el fruto, la calidad de la pulpa (color, textura y sabor), el contenido de sólidos totales y la homogeneidad de formas y tamaños (Edurne et al., 2013).

2.8 LA EXTRACCION DEL ADN PARA ANÁLISIS MOLECULARES

El ADN puede ser extraído de muchos tipos de materiales biológicos, de cualquier ser vivo, en cualquier momento de su desarrollo, empero el éxito del análisis molecular depende del adecuado aislamiento del ADN en términos de cantidad, calidad y pureza (Fonseca et al, 2010; Giraldo et al, 2010).

Los protocolos de extracción o también llamados métodos de aislamiento del ADN, buscan eliminar o diluir inhibidores de reacciones de amplificación que eviten o dificulten los análisis moleculares posteriores. En general, se siguen tres etapas básicas, primero la lisis de las membranas celulares y nucleares, mediante el uso de algún tipo de detergente y altas temperaturas y/u otros métodos mecánicos; segundo, la degradación y precipitación de las proteínas y nucleasas, por incubación con proteínas K y/o sales saturadas, tercero, la

extracción del ADN por medio de su precipitación mediante el uso de alcoholes (Fonseca et al, 2010; Eguiarte et al, 2007).

Uno de los métodos más usados para la extracción de ADN es el de Doyle y Doyle (1990), desarrollado como una alternativa a otros procedimientos de esa época, más caros, largos y de baja eficiencia que incluían ultra centrifugación con cloruro de cesio y producían altas cantidades de ADN degradado. Doyle y Doyle lo describen como una modificación del procedimiento de Saghai-Marroof et al (1984), sin liofilizar las muestras, pero usando el doble de concentración en los compuestos, entre otras modificaciones.

A su vez, este método es modificado para extraer ADN de diferentes tipos de plantas. Estas modificaciones básicamente se basan en cambios en los tiempos y cantidades de las soluciones usadas en función a los requerimientos de cada especie, que a veces pueden tener grandes cantidades de mucopolisacáridos o compuestos secundarios. Algunas plantas almacenan sales en sus tejidos y las reacciones de extracción pueden resultar con alta concentración de sales residuales, lo que se puede controlar con protocolos de limpieza con fenol cloroformo u otras modificaciones al protocolo, lo que a su vez genera nuevos protocolos (Eguiarte et al, 2007).

2.9 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa o PCR consiste en sintetizar in vitro millones de copias de un segmento específico de ADN en presencia de una enzima ADN polimerasa. La técnica se basa en el apareamiento de un par de oligonucleótidos utilizados como “primers” o también llamados cebadores que delimitan la secuencia de ADN “blanco” que se requiere amplificar (Ferreira y Grattapaglia, 1998).

Al manejarse pequeñas cantidades, la técnica necesita un adecuado manejo de los ingredientes y tiempos empleados. Las concentraciones de los ingredientes es de suma importancia por que interactúan entre ellos y pueden inhibir la reacción de no encontrarse en la proporción adecuada. Por ejemplo la polimerasa necesita una adecuada concentración de iones magnesio para funcionar adecuadamente (del rango de 1 a 4 mM), así como de dNTPs y la cantidad adecuada de buffer; por otro lado, un exceso de oligonucleotidos aumenta el rendimiento del PCR pero también propicia la formación de productos inespecíficos o la formación de dímeros (Eguiarte et al, 2007).

En un ciclo de PCR se duplica el número de amplificadores originales, y luego de varios ciclos, las réplicas de la secuencia requerida llegan a un millón de veces la cantidad inicial. Cada ciclo consta de tres etapas: desnaturalización, apareamiento y elongación o polimerización. La desnaturalización del ADN de doble cadena se consigue mediante el aumento de la temperatura de 92°C a 95°C. En la segunda etapa, la temperatura es rápidamente reducida a una temperatura específica que permite la hibridación de cada cebador con las secuencias complementarias que flanquean la región “blanco” (entre 35°C y 60°C). Luego la temperatura es elevada nuevamente a 72°C para que la enzima ADN polimerasa realice la extensión de la cadena (Ferreira y Grattapaglia, 1998).

Existen diferentes variantes de la técnica de PCR, uno de ellas es la Touchdown que, en lugar de usar una temperatura específica de hibridación para los cebadores, inicia con una temperatura más alta de la esperada, mientras que en los siguientes ciclos ésta es disminuida (usualmente un grado) hasta finalmente alcanzar una mínima temperatura de hibridación que en adelante es usada para los ciclos remanentes (unos diez o más). Conforme va bajando la temperatura, los cebadores se unirán a secuencias inespecíficas pero su amplificación será mínima en comparación con el producto específico. Este método es usado usualmente cuando no se sabe la temperatura específica de hibridación de un cebador, o cuando se requiere amplificar múltiples amplicones con diferentes primers con temperaturas de hibridación distintas (Viljoen et al, 2005).

2.10 MARCADORES MOLECULARES

“Un marcador genético puede definirse como un identificador de un aspecto particular en el genoma, por ejemplo: un nucleótido o una secuencia corta de ADN. Este puede describir una variación, la cual puede observarse, y que podría haber aparecido debido a mutaciones o alteraciones en posiciones fijas del genoma (loci). La herencia de un marcador genético puede seguirse fácilmente de generación a generación” (Reynolds et al., 2013).

Actualmente, los marcadores moleculares son herramientas imprescindibles en diferentes estudios de evolución, ecología, bio-medicina, ciencias forenses y estudios de diversidad (Eguiarte et al, 2007). Muchas de las complicaciones del análisis clásico por fenotipo del mejoramiento tradicional, pueden ser mitigadas a través de la identificación directa del genotipo, para ello los marcadores moleculares ofrecen una ventaja en las diferentes estrategias de mejoramiento (Ferreira y Grattapaglia, 1998).

Entre los marcadores moleculares que han sido probados en *C. moschata* destacan los RFLPs, RAPDs, AFLPs, ISSRs, y SRAPs.

La técnica de RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) consiste en digerir el ADN con enzimas de restricción específicas, produciendo pequeños fragmentos de ADN, diferentes en longitud según la composición del ADN, que al correr en una electroforesis producen patrones que sirven para diferenciar especies e inclusive razas entre sí. La diversidad se mide como la presencia o ausencia de sitios de restricción en el ADN. Si un sitio de restricción está ausente, el fragmento esperado no se observa. Entre sus desventajas se encuentra su alto costo, metodología complicada, y el uso de sondas específicas y sustancias radioactivas (Eguiarte et al, 2007; Wilches, 2004).

Los marcadores RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) consisten en amplificaciones de fragmentos de ADN mediante la técnica de PCR con la ayuda de un cebador de aproximadamente 10 bases de nucleótidos, conocido por el investigador. Estos fragmentos forman un patrón comparable con otros individuos de la misma especie o género. (Wilches, 2004). Se trata de un marcador dominante, es decir, no puede distinguir los homocigotos de los heterocigotos. Entre sus ventajas se encuentra que amplifica regiones codificantes como no codificantes, revela alta variación y se trata de una técnica sencilla, sin embargo, su principal desventaja es su falta de reproducibilidad (Eguiarte et al, 2007).

La técnica de AFLP es, en cambio, la combinación de las ventajas de los RAPD y RFLP, ya que involucra la acción de enzimas de restricción y pre amplificación por medio de PCR, para una posterior unión de los fragmentos con adaptadores complementarios y una segunda ronda de PCR. Para esta técnica se debe hacer uso de ADN de buena calidad (Wilches, 2004). Detecta múltiples loci-polimórficos y es útil para generar huellas genéticas y mapeo; así como caracterización y estudios filogenéticos. Esta técnica es altamente reproducible y existen kits estandarizados para su uso, sin embargo, tiene un alto nivel de dificultad por la gran cantidad de pasos a seguir para obtener resultados (Eguiarte et al, 2007).

Los SRAP se basan en una técnica que consiste en la amplificación preferencial de ORFs por PCR. Para ello, se necesita la combinación de dos primers diferentes. El primer delantero contiene 17 pares de bases, de los cuales, 14 nucleótidos en el extremo 5' son ricos en C y G, mientras que las últimas tres bases son selectivas. El segundo primer, el de reversa, contiene 19 pares de bases, de los cuales 16 en el extremo 5' son ricos en A y T, y los tres últimos son selectivos. El primer delantero amplifica preferentemente regiones de exones,

mientras que el segundo, el de reversa, tiende a amplificar regiones de intrones. Esta técnica ha sido probada como útil en cucúrbitas (Ferriol et al, 2004).

2.11 MARCADORES MICROSATÉLITES (SSR)

Los microsatélites son secuencias simples repetidas de 2 a 6 bp de longitud, las cuales abundan con una distribución equitativa en el genoma de los eucariontes. Se les llama satélites, porque en un inicio se pensó que eran parte del ADN extra nuclear; y son micro, porque sus repeticiones son mucho más cortas a las de los minisatélites (mayores a 64 bp) descubiertos primero (Loo, 2011).

Los microsatélites o SSRs (secuencias simples repetidas), no codifican proteínas por lo que pueden estar o no asociados con genes, y aún se discute su función en el genoma. Se sabe que estas secuencias están distribuidas más o menos al azar dentro del genoma en una frecuencia relativamente alta (10 al 50% del genoma de algunos organismos) (Wilches, 2004). La cantidad de unidades de repetición varía en miembros de una misma especie debido a un ocasional deslizamiento cuando se copia un microsatélite, lo que determina la inserción o la delección (menos frecuente) de una o más unidades de repetición; estas mutaciones repentinas pueden recombinarse y esparcirse fácilmente en la población debido justamente a que no codifican proteínas. Su multiallelismo, alto polimorfismo y herencia codominante (se visualizan todos los alelos heredados) los hacen muy útiles para los genetistas (Phillips et al., 1995; Reynolds et al., 2013; Ferreira y Grattapaglia, 1998).

Se ha comprobado que la estrategia de diseñar “primers” universales es más problemática para los SSR. Se dan algunas excepciones con SSR altamente conservados de ballenas, tortugas y peces que permitieron amplificación cruzada de especies que divergieron hace 470 millones de años (Wilches, 2004). Para conseguir cebadores de microsatélites, se evalúa una biblioteca genómica de una determinada planta usando elementos repetitivos como sonda (ejemplo una sonda poli GT para identificar secuencias que tengan repeticiones GTn). Luego se secuencian estos fragmentos para conocer los flancos del elemento repetitivo (Phillips et al., 1995). Estos flancos serán usados como “cebadores” de las secuencias microsatélites existentes en el ADN problema, permitiendo la amplificación por medio de la técnica de PCR. La detección de los amplificadores se hace mediante geles de poli(acrilamida) o agarosa especial de alta resolución para permitir la separación de secuencias con sólo unos cuantos pares de bases de diferencia (Ferreira y Grattapaglia, 1998).

2.12 VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE LOS MARCADORES MICROSATÉLITES

Debido a su facilidad de manejo, los microsatélites son herramientas muy útiles ya que son altamente reproducibles y por ello confiables. Aún sin relacionar un amplificado con algún gen de importancia, los microsatélites ya pueden ayudar en la identificación y discriminación de individuos. Esta información es de mucho interés para posteriores estudios de identificación de parentales, control de cruzamientos, estudios de diversidad y distancia genética. De hecho, si se examinan suficientes microsatélites, se puede crear un perfil genético único para cada individuo (Brown, 2008; Ferreira y Grattapaglia, 1998). En el largo plazo, son buenas plataformas para implementar sobre ellos el mapeo de locus de caracteres cuantitativos (QTL) y selección asistida por marcadores en programas de mejora genética de plantas (Reynolds et al., 2013).

Sin embargo, como toda herramienta también tiene algunas desventajas. La primera y más importante es el costo y la experiencia técnica requerida para el clonamiento y secuenciamiento de los loci SSR. La segunda es la aparición de alelos “nulos”, producto de mutaciones poco frecuentes ocurridas en el sitio donde se aparea el cebador con el ADN diana. Usualmente, esto sucede en estudios en los que se han utilizado marcadores diseñados para otras especies o subespecies. En general la transferibilidad de los SSR no es buena. Los demás problemas se refieren a la calidad de la técnica PCR usada y la interpretación correcta de las bandas (Chambers y MacAvoy, 2000; Pico y Esteras, 2012).

2.13 MEDIDAS DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA

Resulta prácticamente imposible revisar todas las variables genéticas presentes en una población, sin embargo, si se puede examinar a través de la variación de fenotipos individuales (descripción de ciertos rasgos morfológicos y fisiológicos) o de sus genotipos (marcadores moleculares). Para poder realizar el análisis e interpretar correctamente los datos obtenidos mediante el uso de marcadores moleculares, se hará uso como mínimo con ciertos parámetros y conceptos (Vicente et al, 2004).

La frecuencia alélica, genotípica y fenotípica son definidas (en orden) como la proporción de un alelo, un genotipo y un fenotipo dado en una población (Vicente et al, 2004). La frecuencia génica es de mucha ayuda en los análisis de genética de poblaciones, estructura genética, y diversidad genética; y se puede calcular fácilmente. Por ejemplo, si definimos un individuo homocigoto como el que tiene alelos idénticos para un determinado gen, si en una

población todos los individuos fueran homocigotos para este gen, entonces la frecuencia del alelo sería de 1.0. (Loo, 2011).

El polimorfismo o la tasa de polimorfismo (P_j) ayuda a determinar si un gen es variable. Un gen se define como polimórfico si la frecuencia de uno de sus alelos es menor o igual a 0.95 ó 0.99. Con este criterio, además también se puede definir como raro o poco común a los alelos cuyas frecuencias sean menores a 0.005. (Vicente et al, 2004).

Estadísticos F (Wright) permiten el análisis de estructura en poblaciones subdivididas. A su vez pueden emplearse para medir la distancia genética (diferentes frecuencias alélicas entre subpoblaciones sugiere que no haya apareamiento entre ellas) y esta última también provee una manera de medir la probabilidad de encuentro entre alelos iguales (endogamia). Los índices son: F_{IS} = la deficiencia o el exceso de heterocigotos promedio en cada población. F_{ST} = el grado de diferenciación génica entre las poblaciones, en función de las frecuencias alélicas y F_{IT} = la deficiencia o el exceso de heterocigotos promedio en un grupo de poblaciones (Vicente et al, 2004).

El índice de Shannon es una aplicación de la teoría de la información, basado en la idea de que la mayor diversidad corresponde a la mayor incertidumbre en escoger aleatoriamente un individuo de una especie en particular. Para el índice de Shannon el valor mínimo es 0, que indica ausencia de diversidad, o un monocultivo. Los ecosistemas naturales relativamente diversos tienen un índice de Shannon de 3 o 4 (Gliessman, 2002)

Heterocigosidad promedio esperada (H_e) (diversidad genética de Nei [D]) Es la probabilidad de que, en un locus único, cualquier par de alelos, escogidos al azar de la población, sean diferentes entre sí. La " H_e " promedio de todos los loci es una estimación del grado de variabilidad genética en la población. Varía de 0 a 1, y se debe considerar que el valor calculado puede verse afectado por aquellos alelos presentes en frecuencias mayores, se maximiza cuando hay muchos alelos cuyas frecuencias son iguales y debe analizarse un mínimo de 30 loci en 20 individuos por población, para reducir el riesgo de sesgo estadístico (Vicente et al, 2004).

2.14 REVISIÓN DE ESTUDIOS MOLECULARES EN CUCÚRBITAS

Rebecca Brown realizó en el 2001 una revisión del desarrollo de herramientas moleculares para el uso en el mejoramiento de las especies del género *Cucurbita* y concluyó que está muy retrasado en comparación a los otros cultivos, incluso al género *Cucumis* de la misma familia.

La misma Brown señala que Lee y otros desarrollaron en 1995 un mapa basado en marcadores RAPDs de un cruce de *C. pepo* x *C. moschata*, sin embargo, eligieron identificadores arbitrarios para los marcadores en su mapa lo que impedía comparación con otros mapas de *Cucurbita*. Un mapa del genoma del género era necesario para identificar marcadores de características agronómicas importantes (Brown, 2001).

En el 2004, en España, uno de los mayores productores de calabazas, se examinaron 47 accesiones de la amplia colección de germoplasma de *C. moschata* del Centro de Conservación y Mejora de la Agrobiodiversidad Valenciana (COMAV). El objetivo era caracterizar la colección y hacerla útil para los agricultores ya que las clasificaciones comerciales se quedaban cortas con la gran diversidad morfológica de frutos en Cuba, Korea y Puerto Rico. Las muestras provenientes de las Isla Canarias, La Península española y algunas accesiones de Centro y Sur América fueron analizadas con la técnica SRAP y AFLPs. El análisis molecular y morfológico demostraron la gran diversidad genética, sin embargo, los marcadores moleculares agruparon las muestras según su origen geográfico de forma diferente a su morfología (Ferriol et al, 2004).

Gong et al. (2008) muestra un mayor aporte al desarrollar 500 marcadores microsatélites para el género *Cucurbita*. Estos marcadores SSR muestran una alta transferencia (90%) entre las especies del género. Las secuencias SSR estaban altamente conservadas, representando loci ortólogos (secuencias altamente similares debido a que se han originado en un ancestro común) entre *C. pepo* y *C. moschata*, lo que sugiere una estrecha relación filogenética entre las dos especies. Mas sólo un 30.1% de los marcadores para *C. pepo* eran polimórficos para *C. moschata* en contraste con los 50.5% de cebadores de *C. moschata* polimórficos para *C. pepo*.

Estas diferencias, según el mismo artículo (Gong et al., 2008), pueden deberse a la domesticación de ambas especies, el fruto de *C. pepo* suele consumirse en forma inmadura mientras que en *C. moschata* se espera la maduración del fruto, por lo que, durante años, *C.*

pepo ha sufrido mayor cantidad de ciclos de selección, acumulando mayor cantidad de mutaciones que *C. moschata*.

En Colombia, en el año 2008, se realizó una caracterización molecular mediante AFLPs de 121 introducciones de *C. moschata* del Banco de Germoplasma del Programa de Investigación de Hortalizas de la Universidad Nacional de Colombia, sede de Palmira. La diversidad genética encontrada fue alta, además de que, como otros estudios, hubo interrelación entre las zonas de colecta cercanas y las distancias genéticas encontradas (Restrepo y Vallejo, 2008).

En el año 2011, un grupo de investigadores realizaron el análisis molecular con RAPDs e ISSRs de muestras de zonas de cultivos de cucúrbitas en Rio de Janeiro, Brasil. El análisis diferenció exitosamente las especies, sin embargo, no logró lo mismo en referencia a la diversidad intraespecífica, encontrándose muestras idénticas a pesar de que cada muestra era el conjunto del ADN de 12 individuos, representando cada muestra un lugar de colecta diferente (Hilma et al, 2012).

En el 2012, en Colombia se hizo un estudio de *C. moschata*, producto de mucha importancia agrícola en ese país, para generar bancos de ADN e incluso identificar marcadores moleculares que sirvan como códigos de barra en su identificación. Al evaluar ocho marcadores sólo se consiguió uno (espaciador ITS4-ITS5 del cistron 18S-5.8S-26S del ADN ribosomal) que diferenciara a *C. moschata* con *C. máxima* con una identificación precisa del 87% y 95% a nivel de género y especie. Sin embargo, esta herramienta no tuvo la capacidad de identificar la subespecie *C. moschata* sp, lo que indica que, a nivel de variedades o subespecies, no puede ser correctamente discriminados por este código de barras de ADN. El mismo estudio recomienda que para estos casos puede ser adecuado el uso de otros marcadores moleculares (Por ejemplo: SNP, SSRs, etc.) como herramientas auxiliares para el código de barra de ADN (Cañar, 2012).

En el Perú hay registro de dos estudios diferentes con microstelites en Loche de Lamabayeque, la primera expuesta en el Primer congreso peruano de mejoramiento Genético y Biotecnología agrícola que se realizó en La Molina – Lima en mayo 2008, donde se compararon muestras colectadas en el año 2008 de Loche de Lambayeque y Amazonas con otras especies de cucurbitas. Lamentablemente el estudio, al ser un resumen, no brinda información detallada de la metodología y resultados, por ejemplo, no brinda una lista de los cebadores usados para su análisis. Sin embargo, se concluyó que con marcadores

microsatelites se pueden diferenciar las especies de *Cucurbita*, pero no los Loches provenientes de distintos lugares. (Arbizu et al, 2010).

A un resultado similar llego un nuevo análisis con microsatélites en Loche colectado también en el año 2008, el resultado fue publicado junto a más estudios sobre el Loche de Lambayeque en el libro “El Loche (*Cucurbita moschata* Duchesne ex Lam.), su historia, cultivo, características agroclimáticas, genéticas y composición del fruto”, en el cual se encuentra por medio de estudios preliminares, que las poblaciones de Loche en distintas provincias de Lambayeque conforman una población genéticamente homogénea, estos resultados derivaron en este estudio para su confirmación, comparación, y análisis.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 MATERIALES

3.1.1 MUESTRAS VEGETALES

En el año 2013, se colectaron 23 muestras de hojas tiernas de Loche (*C. moschata*) provenientes de tres distritos diferentes de Lambayeque: Eten, Illimo y Poma III. Las muestras fueron colocadas y almacenadas en sílica gel para ser trasladadas los laboratorios del área de Biología Molecular del Instituto de Biotecnología (IBT) de la Universidad Agraria La Molina, donde fueron conservadas en refrigeración hasta la extracción del ADN.

En la Figura 3 se observa una planta de Loche seleccionada para colecta en un campo agrícola mientras que en la tabla 2 se muestran los datos de las fichas de colección de las muestras: código asignado, agricultor del cultivo de donde se obtuvo la muestra, y el distrito de Lambayeque a donde pertenece.



Figura 3. Planta de Loche con flor masculina. Nótese que aún no presenta los granos de polen.

Tabla 2: Especificaciones de las muestras colectadas en el 2013.

CÓDIGO	AGRICULTOR	DISTRITO
L1	Domingo Ruíz	Eten
L2	Rogelio Millones	Eten
L3	Pedro Seumache	Eten
L4	Rogelio Serrán Zarpan	Eten
L5	Victor Manuel Seumache	Eten
L6	Avelino Chapoñan Peralta	San Jorge - Illimo
L7	Avelino Chapoñan Peralta	San Jorge - Illimo
L8	Roman Purizaca Santiesteban	San Jorge - Illimo
L9	Zeno Velasquez	San Jorge - Illimo
L10	José Delgado	Pomac III
L11	Heysi Ubillus	Pomac III
L12	Idelso Velarde Coronado	Pomac III
L13	Asención Benites Roque	Pomac III
L14	José Ramirez	Pomac III
L15	Fredy Velazques castillo	Pomac III
L16	Eddy Ubillus	Pomac III
L17	Luisa Benites Asalde	Pomac III
L18	Juan García Coronado	Pomac III
L19	Miguel García Benites	Pomac III
L20	Andres Benites Roque	Pomac III
L21	Modesto Benites Roque	Pomac III
L22	Juan García Coronado	Pomac III
L23	Juan García Coronado	Pomac III

Adicionalmente, se utilizaron quince muestras de ADN obtenidas de hoja de loche de la colecta del año 2008, en las mismas zonas de donde obtuvieron las muestras con las que se ha realizado el presente estudio. De este modo, se ha logrado comparar el estado de diversidad genética en dos tiempos diferentes.

3.1.2 MATERIALES DE LABORATORIO

Para la extracción y cuantificación del ADN genómico se utilizaron los siguientes reactivos:

- Buffer de extracción CTAB (Bromuro de hexadeciltrimetil amonio) (Anexo 1)
- β -mercaptoetanol
- Cloroformo
- Etanol Absoluto
- Alcohol isoamílico
- RNAsa tipo A (Bovino) 10 mg/ml
- Agua desionizada estéril (Agua MiliQ)

Para la amplificación del ADN por medio de la técnica de PCR en los loci microsatélites:

- Enzima DNA Polimerasa TaqCIPz
- Buffer 10X de PCR (10Mm Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl)
- Iniciadores o primers microsatélites diseñados por Gong y otros (2008)
- Set de Desoxiribonucleótidos trifosfatados (dNTPs)
- MgCl₂
- Agua MiliQ

Para la electroforesis y detección de bandas:

- Gel poliacrilamida al 6 por ciento
- Marcador de peso molecular GeneRuler™ 50bp DNA Ladder
- Buffer TBE (Tris-Ácido Bórico-EDTA) (Anexo 2)
- Ácido acético, etanol, nitrato de plata, hidróxido de sodio y formaldehído.

Otros materiales

- Tubos Eppendorf de 1,5 ml
- Morteros y pilones
- Tubos Eppendorf para PCR
- Puntas para micropipetas de 0,5 a 10 µl, de 10 a 100 µl y de 100 a 1000 µl
- Guantes de nitrilo
- Papel toalla
- Papel aluminio
- Probetas de 50, 100 y 1000 ml
- Erlenmeyers de 125, 250 y 500 ml
- Tubos

Equipos usados durante el procesamiento de las muestras y análisis de datos:

- Espectrofotómetro UV/Visible
- Congeladora a -20 °C y -4°C
- Refrigeradora
- Micropipetas graduables de 0,5 a 10 µl, de 2 a 20 µl, de 20 a 200 µl y de 100 a 1000 µl
- Baño María

- Potenciómetro
- Centrífuga
- Espectrofotómetro UV/Visible
- Termociclador GeneAmp 9700 (Perkin Elmer, Applied Biosystems)
- Balanza analítica
- Cámaras de electroforesis vertical.
- Fuente de poder
- Autoclave
- Computadora
- Impresora

3.2 MÉTODOS

3.2.1 EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO

El procedimiento de extracción de ADN se realizó mediante un protocolo modificado de Doyle y Doyle (1990), conteniendo el tampón CTAB al 2%, aplicado a tejido foliar que previamente estuvo deshidratado con silicagel y mantenido en frío desde su recolección.

El procedimiento de extracción de ADN se realizó mediante un protocolo modificado con buffer CTAB establecido por Doyle y Doyle (1990). El tejido foliar utilizado en este proceso fue deshidratado con silicagel y mantenido en frío desde su recolección.

Para cada muestra se realizó lo siguiente:

1. Se quitaron las nervaduras de cada hoja para cortarla en pedazos pequeños con ayuda de un bisturí estéril.
2. En un mortero frío (-20°C) se trituraron estos pedazos con 1000 ul de buffer de extracción CTAB (Bromuro de hexadeciltrimetil amonio) y 2ul de β-mercaptoetanol. El líquido resultante de la trituración fue transferido a un tubo eppendorf de 1.5 ml y el contenido se mezcló por inversión.
3. El tubo fue incubado a 65°C durante 45 minutos, agitándose por inversión cada 15 minutos.

4. Después de la incubación el tubo fue llevado a una temperatura de 20 °C por cinco minutos y luego se agregó al tubo 700 ul de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) mezclándose por inversión.
5. Esta mezcla fue centrifugada a 14000 rpm por 15 minutos y a una temperatura de 4°C. El sobrenadante resultante de la centrifugación fue transferido a un nuevo tubo eppendorf.
6. Luego, al nuevo tubo se añadió 500 ul de etanol absoluto frío y se mezcló suavemente hasta ver la medusa de ADN. Esta mezcla fue llevada a una temperatura de -20°C por 30 minutos y luego se centrifugó a 14000 rpm por 20 minutos a 4°C.
7. Posteriormente se eliminó el sobrenadante, dejando secar el tubo, por un período de 1 hora. El precipitado fue lavado 2 veces con 1 ml de etanol de 70% por tres minutos. El etanol del lavado fue descartado.
8. Se agregó nuevamente al tubo 1 ml de etanol absoluto. El contenido del tubo fue centrifugado a 14000 rpm durante 30 minutos y se eliminó el etanol.
9. Se dejó que el precipitado seque a temperatura ambiente durante toda la noche.

Luego de este periodo se pudo observar que el precipitado de cada muestra presentaba coloración oscura por lo que se decidió realizar más lavados con etanol 70%.

10. Se re suspendió el precipitado de cada muestra en 100 ul de agua desionizada estéril y fueron incubados a 65°C durante 45 minutos.
11. Luego estas muestras fueron llevadas a -20°C por 5 minutos y se repitieron los pasos desde el uso de cloroformo: alcohol isoamílico hasta los lavados con etanol al 70%.
12. El precipitado de cada tubo se re suspendió en 100 ul de agua destilada estéril.
13. Finalmente, para eliminar cualquier interferencia en este procedimiento, cada tubo sometido a la acción de la enzima RNAsa (10 mg/ml), obteniéndose así los stocks madre.

3.2.2 CUANTIFICACIÓN Y CALIDAD DEL ADN

Para determinar la cantidad de ADN recuperado en la extracción y la calidad del mismo, se midió el nivel de absorbancia a 2 longitudes de onda (260 nm y 280 nm) en los stocks madres con ayuda de un espectrofotómetro UV/visible. Se obtuvo la estimación de la concentración en ng/ μ l y la relación A260/A280, que debe alcanzar un valor entre 1.8 a 2.0, indicando una buena pureza del ADN. A partir de estos datos de rendimiento se prepararon las diluciones de trabajo de las muestras de ADN de modo que la concentración final sea de 5ng/ μ l. para su uso en la amplificación por PCR con marcadores microsatélites.

3.2.3 AMPLIFICACIÓN CON MARCADORES MICROSATÉLITES

Para la amplificación del ADN en las muestras con los marcadores microsatélites se utilizó un protocolo estandarizado para cebadores microsatélites que ha sido probado en trabajos previos con *C. moschata* en el Área de Biología Molecular del Instituto de Biotecnología (IBT).

Se utilizaron 15 pares de cebadores o primers SSR desarrollados para el género *Cucurbita* sp. por Gong et al (2008), cuyas secuencias y características se presentan en la Tabla 3, indicando su denominación, número de alelos hallados en ese estudio, las unidades o motivos repetidos y el número de veces que se repiten, las secuencias forward y reverse, así como el tamaño esperado aproximado de los amplificados.

Tabla 3: Características de algunos de los marcadores microsatélites desarrollados por de Gong et al (2008).

NOMBRE DEL MARCADOR	ALELOS	UND. DE REPETICIÓN	REPETICIONES	SECUENCIA FORWARD	SECUENCIA REVERSE	TAMAÑO ESPERADO (BP)
CMTm95	4	apaga	7	AAGAATCAGAGCATGAGAATTGG	ATCTAATATGCCGCGCTCAC	100
CMTm177	3	ttc	13	CAGACGTCTGAACGTTGTCAC	CTGGAGAGGAGCATTGAG	101
CMTmC37	4	cat	6	TCCACACTCAGCTACCACCA	GAAAAGGCAAATGGGGAATC	110
CMTmC44	3	ttc	6	ACCTTCCTCCTCCGTAATGT	GACGAAGCCAACAACACTACAAC	112
CMTm206	mono	ac+ga	5+5	AGGAACGGAGGGATAGAAAAGA	CCTTGTCCCAAGTTGCATA	171
CMTm86	4	ttc	8	CCGCTCTCACCTCTTCTATG	AGAGGTGGGAAGAGAGAAGG	122
CMTm165	4	cata	5	TTCCAGACCCAATTCCCTTA	TCCATGGAGATGGGAGGTAG	126
CMTmC11	3	atg	6	TTGCAACATTTGACTAAATTCCA	CTCCTCTTCTGCCGATCAGT	127
CMTmC3	3	atg	11	CATCAGGGGTACTIONTCCATT	ACTTCCGGAGGTCAGAAGAC	131
CMTm229	3	aag	11	CTGGAGCAGCTGAAGATGTG	GCCAAAATTAACGGAAACG	136
CMTm243	4	ttc	9	GACAGGACAGGTCAACACCTC	AACCCAATTGCACAGCTTCT	139
CMTm155	4	agagagac	4	ACTTGCGGACTTTCACACCT	TGAAATGAACGCAGAATTGC	140
CMTm186	4	gccaag	4	TCCAAATTTGAGGGAAGTGAGT	CCGAGATGAAGAAGGACGAG	146
CMTmC52	4	ttg	6	GTTACGATTTTCATTCTGTCTG	ACGAATACAAAGTTTCTCTCTCC	151
CMTm39	5	tttc	6	ATCTTTGTGCTTCTAACCTTTTTC	TAAAGCTCGAAAAAGCAACC	153
CMTm25	3	ttctct	5	TGAAGCTTTCAGAAATGAATGTG	CTGACGTCGCTACTCATAGCA	158
CMTm9	4	aag+at	11+4	GCCCAGAAGACAAAAGTTTCG	TTTTTGTGTGCGTGTGTGG	158
CMTm232	5	ag+aag	9+10	AGAAAGAAATAAGGAACCCACAG	CGTCTCGCAATTCTTCAACT	196
CMTm103	3	cct	8	AAAGGCCTTGGATTTTCTCC	CCTTTCATGGTGGTGAAGA	198
CMTm211	mono	ct	8	GGGTAGTTTGAGGGCTCGTC	CCTGCAAAGGGAGAAAAGAGA	101
CMTm42	4	gtc	7	ATTGGTGCCGAAGCTATCAC	CCCACGTTATGGAGCAGAAT	211

FUENTE: Gong et al (2008)

Para cada muestra, se preparó un volumen total de la reacción de PCR de 10 μ l, que contenían concentraciones finales de 2ng/ μ l de ADN, 1U de TaqCIPz DNA Polimerasa; 2.5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de los cuatro dNTPs, 0,15 μ M de cada uno de los cebadores sentido y antisentido (Forward y Reverse), y buffer de PCR (10Mm Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl) (todo indicado en concentraciones finales). El volumen de reacción se completó con agua MiliQ estéril. La preparación de cada reacción se puede observar en el siguiente Tabla 4.

Tabla 4: Descripción de reactivos y las concentraciones usadas en la preparación de cada mix de reacción de PCR.

Reactivo	Concentración inicial	Volumen usado en μ l	Concentración final
ADN molde	10ng/ μ l	2.0	2 ng/ μ l
MgCl ₂	25mM	1.0	2.5 mM
DNTPs	2.5 mM	0.8	0.2 mM
Cebador forward	2 μ M	0.75	0.15 μ M
Cebador reverse	2 μ M	0.75	0.15 μ M
Taq polimerasa	5 U/ μ l	0.1	0.05U/ μ l
Buffer de PCR (+kcl)	10X	1.0	1X
Agua miliQ		3.6	
Volumen total		10	

Las reacciones de PCR se amplificaron en un termociclador GeneAmp 9700 (Perkin Elmer, Applied Biosystems), siguiendo un programa de amplificación tipo touchdown. Este programa fue estandarizado en estudios previos en el laboratorio de Biología Molecular del IBT. Consistió en un primer paso a 95 °C por dos minutos, seguidos de siete ciclos de 94 °C por 45 segundos, 68 °C por otros 45 segundos (en este paso la temperatura disminuía 2 °C por ciclo), y 72 °C por un minuto. Continuaban 30 ciclos que consistían en cambios de 94 °C por 45 segundos a 54 °C por 45 segundos, y 72 °C por un

minuto. Finalmente, un paso adicional de 72 °C por 5 minutos para luego bajar de temperatura a 10 °C la cual se mantiene hasta el retiro de los productos de PCR para conservarla a -20 °C.

En la Figura 4 se resumen estos pasos como una línea grafica que sube y baja conforme a la temperatura, similar a la gráfica que arroja el termociclador como resumen de la pcr.

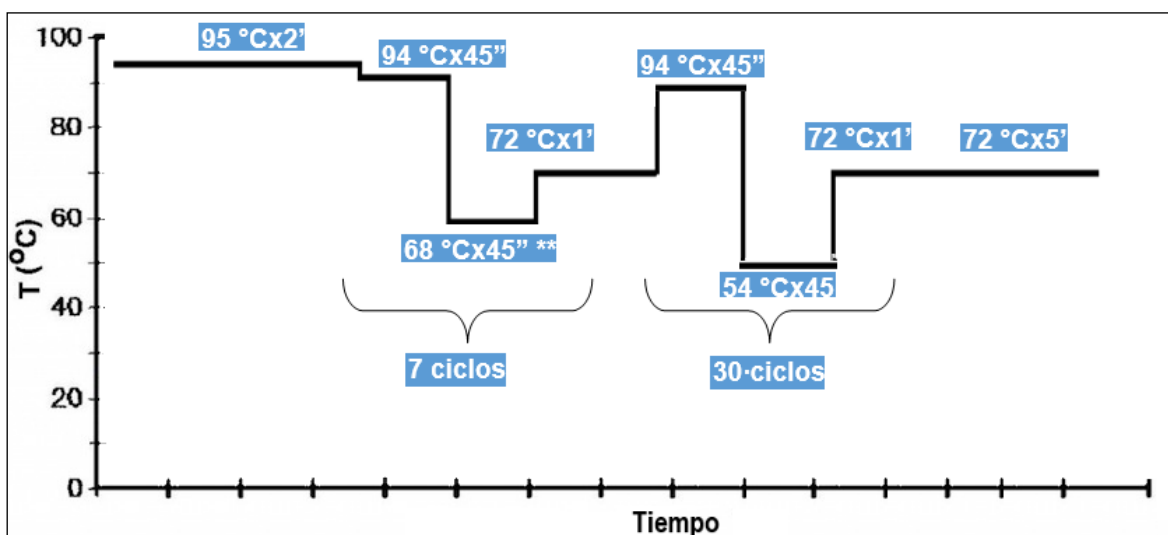


Figura 4. Gráfica del programa de amplificación touchdown usado.

3.2.4 ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA

La separación de los fragmentos de PCR, se llevaron a cabo en un sistema de electroforesis vertical para geles de poliacrilamida al 6 por ciento. Para la elaboración del gel se hizo uso de 60 ml de solución de poliacrilamida, 38 ul de TEMED y 380 ul de persulfato de amonio al 10%. Para el soporte de gel se hizo uso de dos segmentos de vidrio de forma rectangular, uno de ellos con una muesca en uno de los extremos. Para que el gel se adhiriera al vidrio sin muesca se le agregó una solución adherente (Anexo 3) y para que el gel no se adhiriera al vidrio con muesca se hizo uso de una solución repelente de lluvia (Rain X). El ensamblaje del gel de poliacrilamida de detalla en el Anexo 4.

Se utilizó un marcador de peso de 50 pares de bases para determinar el tamaño aproximado de los fragmentos de ADN obtenidos mediante PCR. Previo a la electroforesis, se tienen que preparar las muestras; para ello, de cada muestra de productos amplificados, se tomó 3 ul y se le agregó 3 ul de colorante de carga, como marcador de la trayectoria. Seguidamente, fueron sometidos a una breve desnaturalización, antes de cargar 5 ul de esta mezcla en cada celda o pocillo. Además, en el carril del medio, se cargó el marcador de tamaño de ADN.

Para lograr mejores separaciones de los fragmentos, se realizaron pruebas con productos de diferentes cebadores para determinar el voltaje y tiempo de corrida ideal según el peso del producto de cada marcador. Los geles se corrieron a un voltaje de 400 V durante unas 4 horas en promedio, aunque se varió el voltaje y el tiempo de exposición según el largo del vidrio y el peso esperado del producto.

3.2.5 DETECCIÓN DE BANDAS

Para la observación de las bandas separadas en los geles de poliacrilamida, se prepararon distintas soluciones de fijación, tinción y “stop”, cuya composición se detalla en el Anexo 5.

Los geles con los fragmentos de ADN separados por electroforesis, fueron sometidos primero a un proceso de fijación de los fragmentos de ADN sumergiéndolas en una solución de fijación por 15 minutos; el proceso de tinción consistió en un baño con nitrato de plata por diez minutos mientras que para el proceso de revelado se hizo uso de una solución de hidróxido de sodio por cinco minutos. Para detener el proceso de revelado, se realizó un enjuague con agua destilada eliminando cualquier residuo de las soluciones en el gel e impedir la formación de cristales. Todo se realizó siguiendo un protocolo previamente establecido en el área de Biología Molecular del Instituto de Biotecnología (IBT) de la Universidad Nacional Agraria La Molina.

3.2.6 OBTENCIÓN DE DATOS

Las bandas obtenidas fueron llevadas a datos doble-estado (presencia o ausencia del amplificado del cebador microsatélite usado), donde la presencia de una banda se describe como uno y su ausencia como cero, obteniéndose así una matriz de datos. Asimismo, los datos fueron resumidos en una tabla como pares de letras en un cuadro de Excel y luego al programa de análisis PopGene32 para la obtención de índices. Finalmente se compararon los resultados con estudios anteriores.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1 RESULTADOS DE LA EXTRACCIÓN DE ADN

El método CTAB modificado de Doyle y Doyle (1990) para extracción de ADN, fue usado en forma exitosa en nuestro estudio y también en otros, para la especie *C. moschata* (Ferriol et al, 2004; Hilma et al, 2012; Arbizu et al, 2013). La calidad del ADN obtenida por este protocolo, se evaluó mediante electroforesis en geles de agarosa entre 0.8 y 1.2% (w/v). La pureza se cuantificó mediante espectrofotometría y la Tabla 5 contiene los valores de concentración en ng/ul y la pureza estimada por la relación de absorbancias (A260/A280).

En este estudio, los resultados que observamos en la Tabla 5, corresponden a concentraciones altas si las comparamos a los reportados por otros autores que también trabajaron con cucúrbitas, como Cañar (2012) que obtuvo entre 60 y 80 ng/ul; o el de Restrepo y Vallejo (2008), que obtuvieron en promedio 230 ng/ul de ADN puro no degradado; este último resultado similar al de Brown et al (1998), con 240 ng/ul. Sin embargo, estos resultados obtenidos de concentraciones de ADN, de 367 a 3376 ng/ul, son similares a los obtenidos por Palomino et al (2014) en nuestro laboratorio, para el caso de cultivo de café, los cuales varían entre 382 y 5364 ng/ul.

Para medir la pureza del ADN se utilizó el factor A260/A280, el cual divide la absorbancia de una muestra medida en un espectrofotómetro a 260nm (absorbancia máxima del ADN, debido a los anillos presentes en las bases nitrogenadas) entre el valor la absorbancia medida a 280 nm (la absorbancia máxima de las proteínas residuales del extracto). Un ADN de buena calidad y pureza debe tener un factor que varíe entre valores de 1.7 a 2.0 (Giraldo et al, 2010). Al analizar las muestras de ADN, a pesar de que se encontraron valores de 2.27 como máximo, también hubo 17 muestras con valores menores a 1.7, llegando hasta el 1.14 como mínimo, indicando gran cantidad de proteínas u otros contaminantes.

Tabla 5: Cuantificación en ng/ul y pureza del ADN obtenido de las muestras colectadas en el año 2013

CODIGO	Cuantificación real (ng/ul)	Pureza (A260/A280)
L1	1249	1,41
L2	561	1,54
L3	2332	1,31
L4	1300	1,56
L5	255	2,27
L6	2836	1,2
L7	883	1,84
L8	1281	1,26
L9	2384	1,23
L10	3376	1,21
L11	493	2,19
L12	790	1,64
L13	367	2,27
L14	449	1,79
L15	936	1,35
L16	1080	2,03
L17	893	1,32
L18	800	1,4
L19	869	1,32
L20	3982	1,14
L21	2999	1,19
L22	2674	1,19
L23	2148	1,19
PROM	1519	1.52

Para nuestro estudio, en el cual se amplifica ADN por medio de la técnica de PCR mediante el uso de cebadores microsátélites, no es necesario una gran cantidad de ADN e incluso este puede estar parcialmente degradado, sin influir en el resultado final, a diferencia de usar otros marcadores como los AFLPs que requieren mayor cantidad y pureza de ADN (Gonzales, 2003; Pico y Esteras, 2012), es por ello que los índices de pureza obtenidos se consideraron adecuados para continuar con el análisis con microsátélites.

El método CTAB modificado de Doyle y Doyle usado en esta investigación implicó la preparación y manipulación de forma manual de soluciones consideradas peligrosas como el CTAB, el EDTA y el cloroformo alcohol isoamílico (compuestos denominados cancerígenos) (Cañar, 2012), tal como se indica en el capítulo de materiales y métodos. Es por ello que se recomienda hacer uso de las medidas de seguridad correspondientes (uso de

maskarilla, guantes y campanas de extracción). Para procedimientos menos engorrosos se recomienda hacer uso de un kit de extracción, como en el estudio de Restrepo y Vallejo (2008) donde se obtuvo ADN “*puro, no degradado y de buena calidad*” al usar el kit de extracción DNeasy Plant Mini Kit de QIAGEN con algunas modificaciones al protocolo original.

4.2 COMPARACIÓN DE LOS PATRONES ALÉLICOS DEL LOCHE OBTENIDOS EN EL AÑO 2013 Y 2008

Las muestras colectadas en el año 2013 fueron amplificadas con 15 cebadores microsatélites seleccionados del estudio de Gong et al (2008) en especies de cucúrbitas. Estos cebadores fueron usados anteriormente por Arbizu et al (2010) y López et al (2014) para caracterizar cultivos de Loche durante los años 2008 y 2013.

Debido a la similitud de los resultados con los de López et al (2014), se hizo una comparación de los patrones electroforéticos obtenidos con la muestra del año 2008, y la muestra colectada en el año 2013 y presentadas en el este estudio, de manera que se pueda comprobar la reproducibilidad de los patrones para el análisis y su validez. Para ello se realizó una comparación visual de las imágenes de patrones alélicos del año 2008 y se corrieron nuevamente de entre cinco a quince individuos de esta muestra junto a todos los individuos de la muestra colectada en el año 2013, para la comprobación de que el tamaño y características de los fragmentos o alelos obtenidas eran similares en ambos años. La comparación se realizó para cada uno de los cebadores en los geles analizados.

La comparación también ayuda a la correcta interpretación de los resultados debido a que en muchos casos la toma de data se ve dificultada por la aparición de artefactos y fragmentos de ADN extra generados por el proceso de amplificación o factores variables durante la corrida electroforética (Pico y Esteras, 2012).

Con el primer par de cebadores microsatélites, **CMTm103**, se generó un patrón de alelos idéntico en la muestra colectada en el año 2008 como puede observarse en la Figura 5. El mismo patrón de dos fragmentos muy juntos, pero idénticos, puede observarse en el perfil obtenido en el año 2013 en la Figura 6, donde se corrieron cinco individuos del año 2008 junto a otros veintitrés del año 2013.

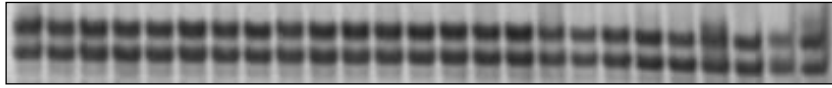


Figura 5. Patrón alélico de la muestra del año 2008 amplificada con el par CMTm103.

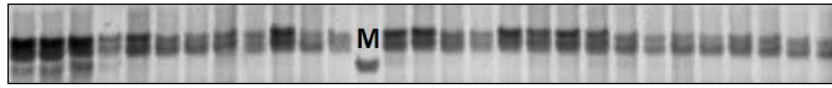


Figura 6. Patrón alélico de la muestra del año 2013 amplificada con el par CMTm103.

La letra “M” en la parte media del gel, corresponde al marcador de tamaño (Figura 6). En esta figura se aprecian unas bandas tenues debajo de las cinco primeras muestras del año 2008 y corresponden artefactos de la amplificación que también se notan en el gel de ese mismo año (Figura 5).

Con el par de cebadores microsatélites **CMTm186** se generaron fragmentos que se visualizaron como bandas simples, ligeramente gruesas e idénticas en todas las muestras, como se observa en la Figura 7. En el año 2013, la corrida electroforética se realizó con dos individuos del año 2008 y los otros veintitrés del año 2013. El resultado se observa en la Figura 8. La letra “M” al medio indica el marcador de tamaño. Pese a algunas diferencias en la forma de las bandas obtenidas (en la Figura 7 se observa un “efecto sonrisa” debido a un mal manejo de la temperatura durante la corrida electroforética y en el año 2013 los fragmentos de ADN no se ven uniformes debido a problemas con el manejo de las muestras amplificadas al añadirlas al gel de electroforesis) el patrón monomórfico es visible en ambos años (2008 y 2013).

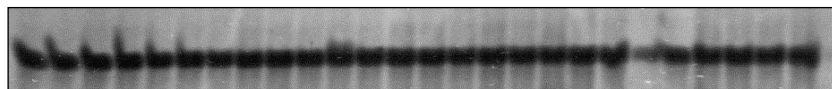


Figura 7. Patrón alélico de la muestra del año 2008 amplificada con el par CMTm186.

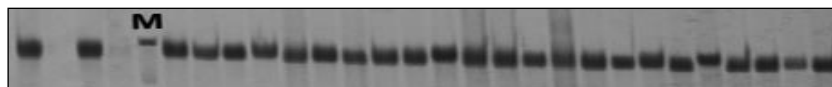


Figura 8. Patrón alélico de la muestra del año 2013 amplificada con el par CMTm186.

El par de cebadores **CMTm42** mostro un patrón de alelos similar al anterior, se observa sólo un fragmento amplificado por cada individuo, pero también la aparición de diversos artefactos. En el año 2008, Figura 9, el resultado de la corrida electroforética de toda la muestra fue un patrón alélico uniforme visualizado como una banda gruesa única. A continuación, se muestra la Figura 10, con el patrón de alelos obtenido al correr cinco individuos del año 2008 y otros veintitrés del año 2013. La letra “M” al medio indica el marcador de tamaño. Un individuo del año 2013 no se replicó correctamente. Los individuos

no replicados correctamente fueron amplificados nuevamente con el cebador respectivo y corridos en un gel aparte para verificar su resultado.

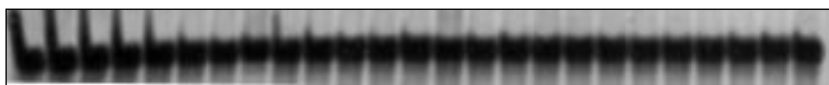


Figura 9. Patrón de alélico de muestra del año 2008 amplificada con el par CMTm42.

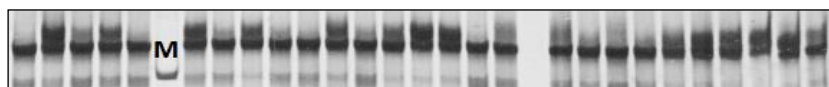


Figura 10. Patrón alélico de la muestra del año 2013 amplificada con el par CMTm42.

Con el par de cebadores **CMTmC11** se obtuvo un patrón constante de un fragmento visualizado como una banda gruesa en todas las muestras del año 2008, lo mismo se observó en la corrida electroforética realizada en el año 2013, la cual contiene tres individuos del año 2008 y los otros veintitrés del año 2013 (Ver Figuras 11 y 12). La letra “M” al medio en la Figura 12 indica el marcador de tamaño. Los fragmentos de ADN son más tenues en esta figura debido a problemas con el proceso de tinción.

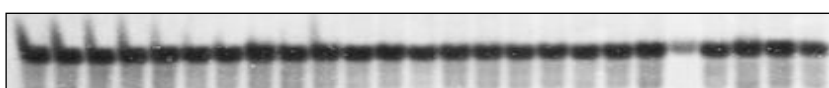


Figura 11. Patrón alélico de la muestra del año 2008 amplificada con el par CMTmC11.



Figura 12. Patrón alélico de la muestra del año 2013 amplificada con el par CMTmC11.

El par de cebadores **CMTmC52** mostró un patrón de dos fragmentos de ADN en todos los individuos, siendo la banda inferior más gruesa que la banda superior. Los resultados de la muestra analizada en el año 2008 se observan en la Figura 13 y los resultados de la corrida electroforética del año 2013, en la Figura 14, en ella se observan siete individuos del año 2008 y los otros veintitrés del año 2013. La letra “M” al medio indica el marcador de tamaño.

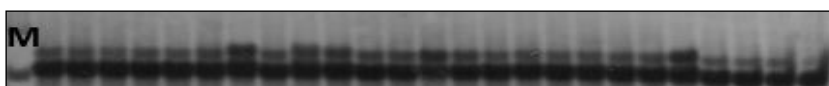


Figura 13. Patrón alélico de la muestra del año 2008 amplificada con el par CMTmC52.

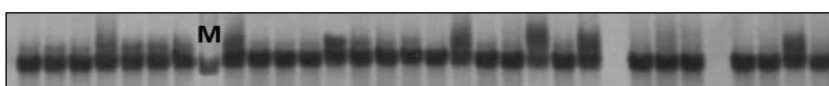


Figura 14. Patrón alélico de la muestra del año 2013 amplificadas con el par CMTmC52.

A diferencia de los anteriores pares de cebadores, con el par de cebadores **CMTmC3** se logró observar un patrón de alelos claramente diferente en cuatro muestras en el año 2008 a

pesar de la gran cantidad de artefactos (Figura 15). En el año 2013 (Figura 16) se corrieron cinco muestras del año 2008 y las otras veintitrés del año 2013. La letra “M” al medio en esta figura indica el marcador de tamaño.

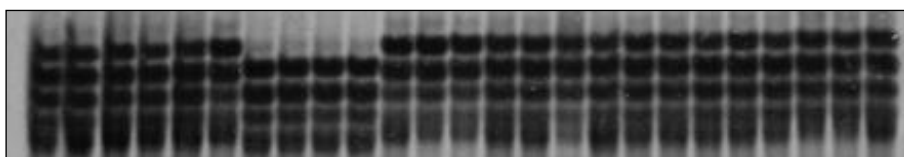


Figura 15. Patrón alélico de la muestra del año 2008 amplificada con el par CMTmC3

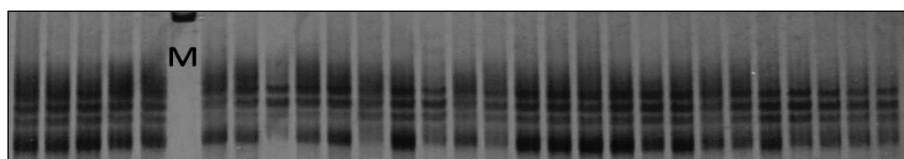


Figura 16. Patrón alélico de la muestra del año 2013 amplificada con el par CMTmC3.

No se observaron bandas polimórficas en este año, a pesar de que se repitió el proceso no se pudo obtener una mejor nitidez. La visualización de una mayor cantidad de bandas espejos o extra es este caso se puede deber a varias causas, como el deslizamiento de la cadena sintetizada durante la amplificación lo que lleva a producción de moléculas de diferente tamaño durante la PCR. Sin embargo, también puede deberse a complicaciones durante la corrida electroforética, debido a que la estructura secundaria de DNA puede retardar la migración en él (Pico y Esteras, 2012).

Con el par de cebadores **CMTm229** se obtuvo un patrón dos bandas difusas idénticas en todos los individuos. En la Figura 17 se observan la muestra del año 2008. En la Figura 18 se observan siete muestras del año 2008 (al final) y las otras veintitrés del año 2013. La letra “M” al inicio de la primera y al medio de la segunda, indica el espacio donde está el marcador de tamaño. También se observaron la aparición de artefactos tenues en algunas muestras.

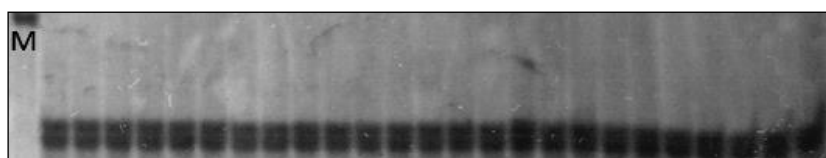


Figura 17. Patrón alélico de la muestra del año 2008 amplificadas con el par CMTm229.

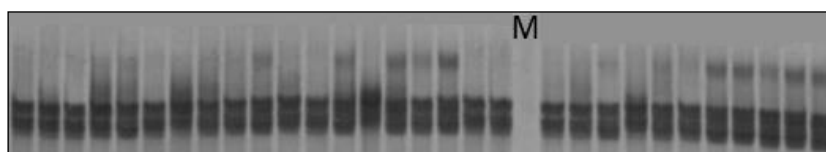


Figura 18. Patrón alélico de la muestra del año 2013 amplificadas con el par CMTm229.

Con el par de cebadores **CMTm39** se obtuvo un patrón de alelos descrito como una doble banda de dos líneas gruesas muy juntas que se puede observar en todos los individuos analizados en el año 2008, tal como se ve en la Figura 19. El mismo patrón se repite en el año 2013, en el cual se corrieron cuatro muestras del año 2008 (ubicadas al final del gel) y las otras veintitrés del año 2013, como muestra la Figura 20. La letra “M” al medio indica el marcador de tamaño.

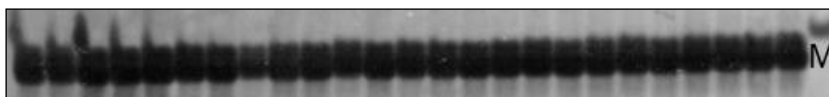


Figura 19. Patrón alélico de la muestra del año 2008 amplificadas con el par CMTm39.

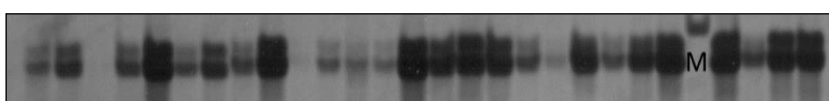


Figura 20. Patrón alélico de la muestra del año 2013 amplificadas con el par CMTm39.

Con el par de cebadores **CMTm165** se obtuvo un patrón similar al anterior, aunque el resultado fue más difuso en ambos años: 2008 (Figura 21) y 2013 (Figura 22). La letra “M” al final de la primera figura y al medio de la segunda indica el marcador de tamaño. El color oscuro del segundo gel se debe a problemas al momento de la tinción de este.

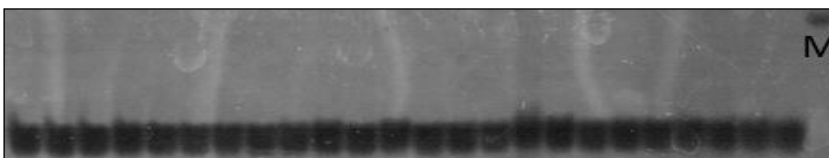


Figura 21. Patrón alélico de la muestra del año 2008 amplificadas con el par CMTm165.

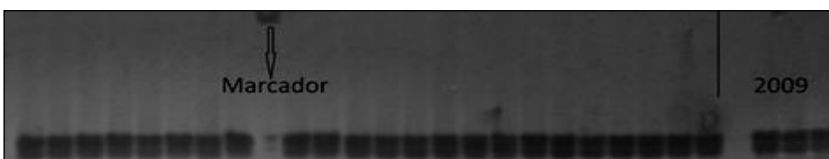


Figura 22. Patrón alélico de la muestra del año 2013 amplificadas con el par CMTm165.

El par de cebadores **CMTm243** mostró un patrón de una banda gruesa única en todas las muestras. En la Figura 23 se observan los fragmentos de ADN obtenidos con la muestra del año 2008 y en la Figura 24 los fragmentos de ADN obtenidos con cuatro individuos del año 2008 (al final) y otros veintitrés del año 2013. La letra “M” al inicio en ambas figuras indica el marcador de tamaño.

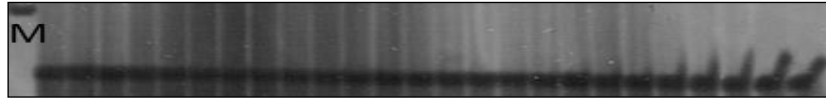


Figura 23. Patrón alélico de la muestra del año 2008 amplificadas con el par CMTm243.

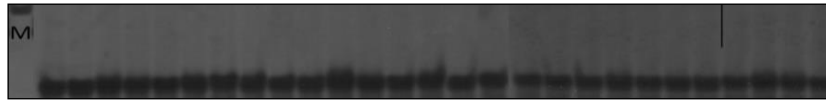


Figura 24. Patrón alélico de la muestra del año 2013 amplificadas con el par CMTm243.

Con en el par de cebadores **CMTmC37** se observó una banda gruesa con artefactos difusos debajo de las mismas. La Figura 25 muestra los resultados del año 2008 y las Figura 26 los resultados del año 20013, donde se corrieron los amplificados de seis individuos del año 2008 y los otros veintitrés del año 2013. La letra “M” al medio indica el marcador de tamaño. En la segunda figura se puede ver mejor los artefactos debajo de la banda principal presente en toda la muestra.

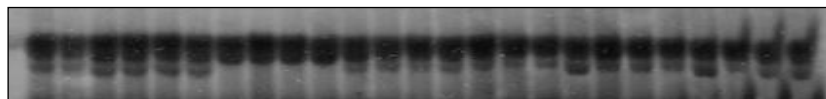


Figura 25. Patrón alélico de la muestra del año 2008 amplificadas con el par CMTmC37.

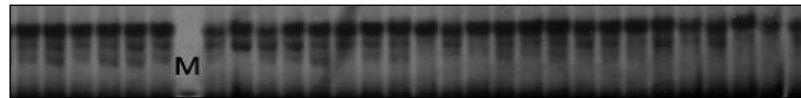


Figura 26. Patrón alélico de la muestra del año 2013 amplificadas con el par CMTmC37.

Con el par de cebadores **CMTm211** se obtuvo el mismo resultado que con la mayoría de cebadores anteriores, un patrón consistente de una banda gruesa que se repite en toda la muestra tanto las del año 2008 como l del año 2013. La Figura 27 muestra los resultados del año 2008 y la Figura 28 los resultados del año 2013.

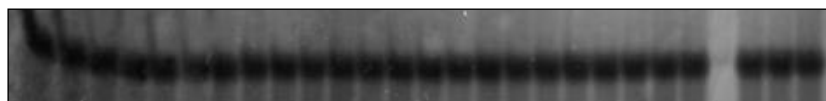


Figura 27. Patrón alélico de la muestra del año 2008 amplificadas con el par CMTm211.

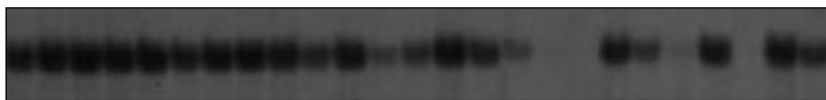


Figura 28. Patrón alélico de la muestra del año 2013 amplificadas con el par CMTm211.

Para el análisis de comparación con cebador **CMTm232** se muestra primero el patrón alélico obtenido de la corrida electroforética de toda la muestra colectada en el año 2008 (Figura 29), donde se observan patrones de un fragmento de ADN en una cantidad considerable de individuos, ocho; a comparación de los veintidós donde se observan dos fragmentos. De

forma diferente la corrida electroforética realizada en el año 2013 muestra menor variación (Figura 30), en este año se incluyeron quince individuos del año 2008 que representan tanto los individuos con dos fragmentos como con uno, y los otros veintitrés individuos luego del marcador de tamaño son del año 2013. La letra “M” al medio indica el marcador de tamaño.

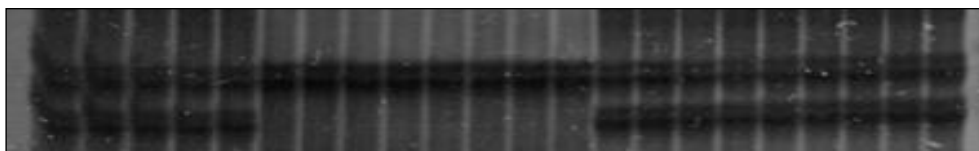


Figura 29. Patrón alélico de la muestra del año 2008 amplificadas con el par CMTm232.

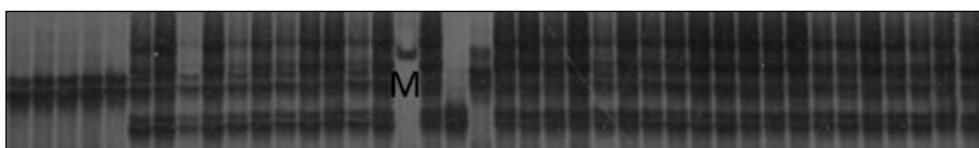


Figura 30. Patrón alélico de la muestra del año 2013 amplificadas con el par CMTm232.

El par de cebadores CMTm232 es el único marcador en el cual se visualiza una diferencia de fragmentos o alelos claramente en ambos periodos de colecta, aunque en el año 2013 solo se observan dos individuos con un patrón de alelos diferentes a comparación de los ocho individuos observados en el año 2008.

Con el par de cebadores **CMTm25** en el año 2008 se obtuvo un patrón uniforme de dos bandas gruesas muy juntas (Figura 31), el mismo patrón se observa en los resultados de la electroforesis del año 2013, donde se corrieron siete individuos del año 2008 y los otros veintitrés del año 2013 (Figura 32). La letra “M” al medio indica el marcador de tamaño.



Figura 31. Patrón alélico de la muestra del año 2008 amplificadas con el par CMTm25.

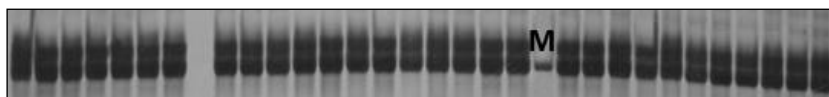


Figura 32. Patrón alélico de la muestra del año 2013 amplificadas con el par CMTm25.

4.3 INTERPRETACIÓN DE LOS PATRONES ELECTROFORÉTICOS Y LA MATRIZ DE DATOS

Luego del análisis visual de los patrones electroforéticos obtenidos, se interpretaron las bandas visualizadas en las diferentes corridas electroforéticas como una matriz de datos binarios, donde el número 1 representa la presencia del producto visualizado como una

banda y el 0 como la ausencia de este. Los resultados obtenidos durante la colecta del año 2013 se muestran en la Tabla 6.

En este estudio, los cebadores microsatélites que se evaluaron, fueron los que estuvieron disponibles para *Cucurbita moschata* y para otras cucúrbitas como *C. máxima* y *C. pepo*. Por ello, se utilizó en el programa de amplificación la opción touchdown PCR, de manera que se obtengan mejores calidades de las bandas o fragmentos.

En la matriz de datos se aprecia que, para las muestras del año 2013, solo se presentan polimorfismos con el cebador CMTm232. Se puede notar además que, en 2 individuos, el patrón de bandas o fragmentos fue diferente, presente el fragmento más pesado en uno y el más ligero en el otro. El resto de individuos presentó el mismo patrón alélico.

Según los datos obtenidos de la interpretación de los patrones electroforéticos, la Tabla 7, nos presenta el estado del polimorfismo obtenido con cada par de cebadores a nivel interespecífico (tres curcubitáceas diferentes de la colecta 2013) y a nivel intra específico (sólo en *C. moschata*).

Tabla 6: Matriz de datos binarios de marcadores SSR con las muestras del año 2013.

L	COLECTA 2013																						
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
CMTm103	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
CMTm186	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
CMTm42	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
CMTmC11	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
CMTmC52	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
CMTm25	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
CMTm229	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
CMTm39	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
CMTm165	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
CMTm243	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
CMTm211	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
CMTm232	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
CMTmC3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
CMTmC37	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

Tabla 7: Polimorfismo de las bandas obtenidas con 15 marcadores de Gong et al (2008)

	Interespecifico	Intraespecifico
CMTm103	Polimórfico	Monomórfico
CMTm186	Polimórfico	Monomórfico
CMTm42	Polimórfico	Monomórfico
CMTmC11	Polimórfico	Monomórfico
CMTmC52	Polimórfico	Monomórfico
CMTm25	Polimórfico	Monomórfico
CMTm229	Polimórfico	Monomórfico
CMTm39	Polimórfico	Monomórfico
CMTm165	Polimórfico	Monomórfico
CMTm243	Polimórfico	Monomórfico
CMTm232	Polimórfico	Polimórfico
CMTmC3	Polimórfico	Monomórfico
CMTmC37	Polimórfico	Monomórfico
CMTm211	Monomórfico	Monomórfico
CMTm9**	**	**

(**) El cebador CMTm9 usado en el estudio de López et al. (2014) no pudo ser considerado debido a la no obtención de una buena calidad de patrones de bandas.

El uso de ISSR o de microsatélites para diferenciar especies de cucúrbitas ha sido comprobado en anteriores ocasiones, como ejemplo el estudio de Hilma et al (2012) en Brasil y el estudio en zapallos del norte del Perú de Arbizu et al (2010), donde se analizaron muestras de otras cucúrbitas adicionales a las muestras de Loche y se reveló que el 93.08% de la variación encontrada se atribuía a la variación entre especies de cucúrbitas. De igual manera, De acuerdo a lo que observamos en la Tabla 7, la gran mayoría de los cebadores seleccionados eran polimórficos a nivel interespecífico (diferenciaban entre especies de cucúrbita) pero muy pocos a nivel intraespecífico en el caso del cultivo de Loche, con la excepción del cebador CMTm211, con el cual se obtenía el mismo resultado en toda la muestra, independientemente de la especie, posiblemente se trata de un locus presente dentro de la familia de las cucurbitáceas.

Así como el cebador CMTm9, los cebadores CMTm44, CMTm86, CMTm95, usadas en el estudio de López et al (2014) no fueron considerados para nuestras pruebas en el año 2013 debido a problemas técnicos similares a los mencionados para el cebador CMTm9.

Para una mayor consistencia de los estimadores en la población de Loche, se realizó la comparación de la muestra del 2013 con la muestra del 2008 (López et al., 2014). De este modo, se tienen datos de colecta en dos períodos de cultivo diferentes y podemos evaluar cómo se comportan los estimadores de estructura poblacional y podemos comprender qué fuerzas están actuando el mantenimiento de la variación.

4.4 ESTIMACIÓN DE PARÁMETROS GENÉTICOS POBLACIONALES CON MARCADORES MOLECULARES MICROSATÉLITES

4.4.1 ESTIMACIÓN DE LAS FRECUENCIAS ALÉLICAS EN LA POBLACIÓN DE LOCHE

A continuación, se realizaron los cálculos de las frecuencias alélicas en la muestra del año 2013 (presente estudio), usando 15 pares de cebadores diferentes y también se calcularon las frecuencias alélicas en la muestra del año 2008 (López et al., 2014) con 22 pares de cebadores diferentes, para poder comparar los resultados después de 5 años de cultivo. Estos estimadores se presentan de modo resumido en tres tablas: Tabla 8 (resultados de las muestras colectadas en el año 2008), Tabla 9 (resultados de las muestras colectadas en el año 2013) y Tabla 10 (resultado de juntar ambas colectas como una única población).

Como se indicó en anteriormente, fueron muy pocos los loci polimórficos; la mayoría correspondieron a loci monomórfico, es decir, presentaron el mismo patrón alélico. En cuanto a las frecuencias alélicas, la Tabla 8, en la muestra del año 2008 según López et al. (2014), nos muestra que hubo polimorfismo con los cebadores CMTm232, CMTmC3, CMTm86 y CMTm95; mientras que en el resto sólo se presentó un tipo de alelo.

Tabla 8: Frecuencias alélicas encontradas de los locus analizados en el año 2008.

Alelos	L	CMT m103	CMT m186	CMT m42	CMT mC11	CMT mC52	CMT m25	CMT m229	CMT m39	CMT m165	CMT m243	CMT m211	CMT m232	CMT mC3	CMT mC37	CMT m86	CM Tm9	CMT m95	CMT m127	CMT m155	CMT m177	CMT m206		
	A		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0.68	0.84	1	0.84	1	1	0.96	1	1	1	1
B													0.32	0.16		0.08			0.04					
C																0.08								

Tabla 9: Frecuencias alélicas encontradas de los locus analizados en el año 2013.

Alelos	L	CMTm10 3	CMTm18 6	CMTm4 2	CMTmC1 1	CMTmC5 2	CMTm2 5	CMTm22 9	CMTm3 9	CMTm16 5	CMTm24 3	CMTm21 1	CMTm23 2	CMTmC 3	CMTmC3 7
	A		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0.5	0.84
B													0.5	0.16	

Tabla 10: Frecuencias alélicas encontradas en la población conjunta de las muestras colectadas en el año 2008 y 2013.

Alelos	L	CMTm10 3	CMTm18 6	CMTm4 2	CMTmC1 1	CMTmC5 2	CMTm2 5	CMTm22 9	CMTm3 9	CMTm16 5	CMTm24 3	CMTm21 1	CMTm23 2	CMTmC 3	CMTmC3 7
	A		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0.589	0.917
B													0.411	0.083	

Pero, al compararla con la muestra del año 2013 (Tabla 9), notamos que casi todos los loci presentaron un patrón monomórfico a excepción del obtenido con el cebador CMTm232, donde se aprecian dos alelos con frecuencias de 0.5.

La comparación de los estimadores de frecuencia génicas en ambos periodos de tiempo, nos indica la ocurrencia de una disminución del valor de este estimador en los loci CMTm232 y que se ha fijado uno de los alelos en el locus CMTmC3, explicado por la ocurrencia de deriva génica, pequeñas áreas de cultivo y selección clonal en la propagación del loche, fenómenos que se discutirán más adelante en la sección de discusiones finales. Adicionalmente, si consideramos todos los datos como una sola población, notamos que dos loci presentaron 2 alelos polimórficos, uno de ellos con frecuencia de uno de los alelos aproximándose a uno (CMTm C3) y el alelo de menor frecuencias de 0.5889 y 0.4111.

4.3.3 ESTIMACIÓN DE LOS ESTADÍSTICOS DE DIVERSIDAD GENÉTICA

Con la ayuda del programa PopGene32 se determinaron los valores del número observable de alelos, el número efectivo de alelos y el índice de diversidad de Shannon, el cual brinda una idea de la diversidad genética de los individuos. Se compararon los estimadores obtenidos en ambos períodos (2008 y 2013). Los resultados se resumen en la Tabla 11 para muestras colectadas en el año 2008, la Tabla 12 para muestras colectadas en el año 2013 y la Tabla 13 para ambas colectas juntas como una única población.

En la muestra del año 2008 (Tabla 11), el número promedio observado de alelos fue de 1.2273; mientras que, en la muestra del año 2013 (Tabla 12), se aprecia una disminución en este valor a 1.0714. Para el número efectivo de alelos (esperado) en el 2008 (Tabla 11), el valor promedio fue 1.0731 y en el año 2013 (Tabla 12) este valor fue 1.0714, coincidiendo en el año 2013 el valor observado con el esperado, a diferencia de los valores obtenidos con la muestra del año 2008.

Según Pardey y García (2011) si los valores en el índice de Shannon tienden a cero, indican una probabilidad baja de obtener un individuo con alelos diferentes al común y se hace nulo cuando el marcador es monomórfico. Examinando el índice de diversidad de Shannon en los dos Tablas anteriores (11 y 12), es muy notoria la pérdida de diversidad promedio entre las muestras del año 2013 (Tabla 12), donde obtuvimos un valor de 0.0495, a comparación del 0.0811 que se obtuvo con los resultados en el año 2008 (Tabla 11); es decir, se ha perdido un 38.96% de diversidad en un periodo de cuatro años, explicado probablemente por una intensa deriva y selección clonal.

Tabla 11: Resumen de estadísticos de diversidad genética para todos los loci analizados en el año 2008

Locus	Tamaño de Muestra	N° observado De alelos*	N° esperado De alelos	Índice de diversidad De Shannon**
CMTmC3	50	2	1.3676	0.4397
CMTm103	50	1	1	0
CMTm9	36	1	1	0
CMTm25	50	1	1	0
CMTmC11	50	1	1	0
CMTmC37	50	1	1	0
CMTm39	50	1	1	0
CMTmC52	50	1	1	0
CMTm42	50	1	1	0
CMTmC44	46	1	1	0
CMTm86	50	3	1.392	0.5506
CMTm95	50	2	1.0832	0.1679
CMTm127	50	1	1	0
CMTm155	50	1	1	0
CMTm165	50	1	1	0
CMTm177	48	1	1	0
CMTm186	50	1	1	0
CMTm206	48	1	1	0
CMTm211	48	1	1	0
CMTm229	50	1	1	0
CMTm232	44	2	1.7664	0.6255
CMTm243	50	1	1	0
Promedio	49	1.2273	1.0731	0.0811
Desv. St.		0.5284	0.1909	0.1916

* Número efectivo de alelos [Kimura and Crow (1964)].

** Índice informativo de Shannon [Lewontin (1972)].

Al igual que con las frecuencias alélicas, calculamos los estadísticos de diversidad para una población compuesta por todos los individuos muestreados en el año 2008 y 2013, y los resultados se muestran en la Tabla 13 en la siguiente página.

Al considerar todos los datos como una sola población (Tabla 13), los valores del número de alelos promedio observado y esperado no se ven muy afectados, siendo 1.1429 y 1.079, respectivamente.

Tabla 12: Resumen de estadísticos de diversidad genética para todos los loci analizados en el año 2013

Locus	Tamaño de Muestra	N° observado De alelos*	N° esperado De alelos	Índice de diversidad De Shanon**
CMTm103	46	1	1	0
CMTm186	46	1	1	0
CMTm42	46	1	1	0
CMTmC11	46	1	1	0
CMTmC52	46	1	1	0
CMTm25	46	1	1	0
CMTm229	46	1	1	0
CMTm39	46	1	1	0
CMTm165	46	1	1	0
CMTm243	46	1	1	0
CMTm211	46	1	1	0
CMTm232	46	2	2	0.6931
CMTmC3	46	1	1	0
CMTmC37	46	1	1	0
Promedio	46	1.0714	1.0714	0.0495
Desv. St.		0.2673	0.2673	0.1853

* Número efectivo de alelos [Kimura and Crow (1964)].

** Índice informativo de Shanon [Lewontin (1972)].

Tabla 13: Resumen de estadísticos de diversidad genética para los loci analizados tanto en el año 2008 como en el año 2013.

Locus	Tamaño de Muestra	N° observado De alelos*	N° esperado De alelos	Índice de diversidad De Shanon**
CMTm103	96	1	1	0
CMTm186	96	1	1	0
CMTm42	96	1	1	0
CMTmC11	96	1	1	0
CMTmC52	96	1	1	0
CMTm25	96	1	1	0
CMTm229	96	1	1	0
CMTm39	96	1	1	0
CMTm165	96	1	1	0
CMTm243	96	1	1	0
CMTm211	94	1	1	0
CMTm232	90	2	1.9387	0.6773
CMTmC3	96	2	1.1803	0.2868
CMTmC37	96	1	1	0
Promedio	95	1.1429	1.0799	0.0689
Desv. St.	-	0.3631	0.2518	0.1911

* Número efectivo de alelos [Kimura and Crow (1964)].

** Índice informativo de Shanon [Lewontin (1972)].

El índice de Shannon, 0.0689, muestra una ligera disminución al compararlo con el índice obtenido con los resultados del año 2008, 0.0811, sin embargo, en los tres casos, se obtuvieron índices bajos de diversidad.

4.3.4 ESTIMACIÓN DE LOS ESTADÍSTICOS DE HETEROCIGOSIDAD.

A continuación, se presentan tablas resumen de resultados obtenidos de estadísticos de heterocigosidad observada, esperada, homocigosidad observada, esperada, y el índice de diversidad génica de Nei por cada locus y los promedios respectivos. La Tabla 14 muestra los resultados de las colectas en el año 2008, la Tabla 15 las colectas en el año 2013 y en la Tabla 16 para ambas colectas juntas como una única población.

Tabla 14: Estadísticos de heterocigosidad para todos los loci analizados en el año 2008

Locus	Tamaño de muestra	Hom. Obs	Het. obs	Hom. esp*	Het. esp.*	Nei**	Het. prom.***
CMTmC3	50	1	0	0.7257	0.2743	0.2688	0.2688
CMTm103	50	1	0	1	0	0	0
CMTm9	36	1	0	1	0	0	0
CMTm25	50	1	0	1	0	0	0
CMTmC11	50	1	0	1	0	0	0
CMTmC37	50	1	0	1	0	0	0
CMTm39	50	1	0	1	0	0	0
CMTmC52	50	1	0	1	0	0	0
CMTm42	50	1	0	1	0	0	0
CMTmC44	46	1	0	1	0	0	0
CMTm86	50	1	0	0.7127	0.2873	0.2816	0.2816
CMTm95	50	1	0	0.9216	0.0784	0.0768	0.0768
CMTm127	50	1	0	1	0	0	0
CMTm155	50	1	0	1	0	0	0
CMTm165	50	1	0	1	0	0	0
CMTm177	48	1	0	1	0	0	0
CMTm186	50	1	0	1	0	0	0
CMTm206	48	1	0	1	0	0	0
CMTm211	48	1	0	1	0	0	0
CMTm229	50	1	0	1	0	0	0
CMTm232	44	0.3636	0.6364	0.556	0.444	0.4339	0.4339
CMTm243	50	1	0	1	0	0	0
Promedio	49	0.9711	0.0289	0.9507	0.0493	0.0482	0.0482
Desv. St.		0.1357	0.1357	0.121	0.121	0.1184	0.1184

Número de loci polimórficos: 4. Porcentaje de loci polimórficos: 18.18%. *Homocigosidad y heterocigosidad esperada fueron calculadas usando Levene (1949). ** Heterocigosidad esperada de Nei (1973). *** Heterocigosidad promedio.

En la Tabla 14 se aprecia que en la mayoría de loci, la heterocigosis esperada es cero, excepto en los casos de CMTmC3, CMTm86, CMTm95 y CMTm232. Asimismo, la heterocigosis observada difiere de la heterocigosis esperada en los cuatro locus mencionados anteriormente, señalando que el resultado de cero en la heterocigosis observada en el caso de lo locus CMTmC3, CMTm86 y CMTm95 se debe a que se encontraron alelos diferentes (polimórficos) mas no heterocigosis, ya que estos alelos se encontraban en forma de dos pares idénticos (AA o BB) más no combinación de estos (AB, sólo A o sólo B). En los valores promedio, un 97.11% de homocigosis observada se enfrenta a un 95.07% de homocigosis esperada, mientras que la heterocigosis observada es de 2.89% frente a una esperada de 4.93%. El índice de diversidad génica de Nei resulta muy pequeño (0.0482 o 4.82%), explicada por la poca superficie de cultivo y selección clonal.

Tabla 15: Estadísticos de heterocigosidad para todos los loci analizados en el año 2013.

Locus	Tamaño de Muestra	Hom. obs	Het. obs	Hom. esp*	Het. esp.*	Nei**	Het. prom.***
CMTm103	46	1	0	1	0	0	0
CMTm186	46	1	0	1	0	0	0
CMTm42	46	1	0	1	0	0	0
CMTmC11	46	1	0	1	0	0	0
CMTmC52	46	1	0	1	0	0	0
CMTm25	46	1	0	1	0	0	0
CMTm229	46	1	0	1	0	0	0
CMTm39	46	1	0	1	0	0	0
CMTm165	46	1	0	1	0	0	0
CMTm243	46	1	0	1	0	0	0
CMTm211	46	1	0	1	0	0	0
CMTm232	46	0.087	0.913	0.4889	0.5111	0.5	0.5
CMTmC3	46	1	0	1	0	0	0
CMTmC37	46	1	0	1	0	0	0
Promedio	46	0.9348	0.0652	0.9635	0.0365	0.0357	0.0357
Desv. St.	-	0.244	0.244	0.1366	0.1366	0.1336	0.1336

Número de loci polimórficos: 1. Porcentaje de loci polimórficos: 7.14%. *Homocigosidad y heterocigosidad esperada fueron calculadas usando Levene (1949). ** Heterocigosidad esperada de Nei (1973). *** Heterocigosidad promedio.

En la muestra del año 2013 (Tabla 15) notamos que la homocigosidad promedio observada es de 93.48% y la esperada es de 96.35%. La heterocigosidad observada fue de 6.526% y la esperada 3.65%. En cuanto al índice de diversidad génica de Nei, fue de 3.57%; es decir, se ha reducido en un 25.93% respecto a la diversidad estimada en el año 2008.

Asimismo, los niveles de polimorfismo también se han reducido del 2008 al 2013, se aprecia que en el 2008 el porcentaje de polimorfismo fue de 18.18% mientras que el porcentaje para las muestras del 2013 fue de 7.14%.

Tabla 16: Estadísticos de heterocigosidad para todos los loci analizados en el año 2008 y 2013.

Locus	Tamaño de Muestra	Hom. Obs	Het. obs	Hom. esp*	Het. esp.*	Nei**	Het. prom.***
CMTm103	96	1	0	1	0	0	0
CMTm186	96	1	0	1	0	0	0
CMTm42	96	1	0	1	0	0	0
CMTmC1 1	96	1	0	1	0	0	0
CMTmC5 2	96	1	0	1	0	0	0
CMTm25	96	1	0	1	0	0	0
CMTm229	96	1	0	1	0	0	0
CMTm39	96	1	0	1	0	0	0
CMTm165	96	1	0	1	0	0	0
CMTm243	96	1	0	1	0	0	0
CMTm211	94	1	0	1	0	0	0
CMTm232	90	0.2222	0.7778	0.5104	0.4896	0.4842	0.4669
CMTmC3	96	1	0	0.8456	0.1544	0.1528	0.1344
CMTmC3 7	96	1	0	1	0	0	0
Promedio	95.4286	0.9444	0.0556	0.9540	0.0460	0.0455	0.0430
Desv. St.		0.2079	0.2079	0.1341	0.1341	0.1327	0.1272

Número de loci polimórficos: 2. Porcentaje de loci polimórficos: 14.29%. *Homocigosidad y heterocigosidad esperada fueron calculadas usando Levene (1949). ** Heterocigosidad esperada de Nei (1973).

Dentro de las tablas se menciona el índice de Nei que cuantifica la probabilidad de cualquier par de alelos dentro un locus, escogido al azar de una población, sean diferentes entre sí (Pardey y Garcia, 2011). En nuestras estimaciones, obtuvimos heterocigosidades esperadas de Nei en promedio de 0.0482 (año 2008), 0.0357 (año 2013) y 0.0455 en la población conjunta respectivamente. Arbizu et al (2010) reportaron un índice de heterocigosidad esperada de 0.1 en los Loches de Lambayeque. Debe tomarse en cuenta que las muestras usadas por Arbizu et al (2010) vinieron de una colecta del año 2008, a la vez que hizo uso de muestras del mercado de Lambayeque entre las que se encuentran los llamados “Loche de montaña”, que probablemente son muestras de “zapallo Loche” obtenido de semilla como se les conoce por los consumidores, así como no se les considera “Loche verdadero”, según Moreano (2013).

4.3.5 ESTIMACIÓN DEL ÍNDICE DE FIJACIÓN DE WRIGHT

Los estadísticos de F se usan para cuantificar la diversidad genética entre los individuos y visualizar la estructura dentro de este conjunto, en términos de tres variables: Fis, que indica la correlación entre alelos homólogos en individuos con referencia a la población local; Fit, que indica la correlación alélica correspondiente (Hernández-Baños et al, 2007) y finalmente, FST mide el grado de diferenciación génica entre los individuos, en función de las frecuencias alélicas. El valor va de 0 a 1 donde cero significa que no existe divergencia génica y 1 significa que los alelos están fijados (Pardey y García, 2011). A continuación, se presentan los resultados de los cálculos para el índice Fis para las muestras del año 2008 (Tabla 17), 2013 (Tabla 18) y ambas poblaciones como una sola (Tabla 19).

En todas las tablas, se analiza el índice de fijación de Wright (1978) (Fis) como medida de la deficiencia o exceso de la heterocigosidad de los locus analizados, el valor fis analizado varía entre -1 y 1, y convencionalmente se define como la probabilidad de que dos alelos en un individuo sean idénticos por descendencia respecto a la subpoblación. En la Tabla 17 se observa que los loci CMTmC3, CMTm86, CMTm95 y CMTm232 son los únicos que obtuvieron valores calculables, siendo sólo el de CMTm232 diferente de uno. En las Tablas 18 y 19, el mismo locus, CMTm232, presenta valores diferentes del uno también, pero en los tres casos se trata de valores negativos, lo cual en otra situación podría considerarse como exceso de heterocigosis o exogamia (falta de endogamia), sin embargo, muy probablemente, los valores obtenidos reflejen que los alelos se mantienen en un estado de heterocigosis permanente al no dárseles la oportunidad de segregarse debido a la práctica de propagación clonal del cultivo.

Tabla 17: Índice de fijación de Wright de los locus analizados en el año 2008.

Alelos	L	CMT m103	CMT m186	CMT m42	CMT mC11	CMT mC52	CMT m25	CMT m229	CMT m39	CMT m165	CMT m243	CMT m211	CMT m232	CMT mC3	CMT mC37	CMT m86	CMT mC44	CM Tm9	CMT m95	CMT m127	CMT m155	CMT m177	CMT m206	
	A	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	-0.47	1	*	*	*	1	1	*	*	*	*
	B													-0.47	1				1	1				
	C																		1					
T	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	-0.47	1	*	*	*	1	1	*	*	*	*	

Tabla 18: Índice de fijación de Wright de los locus analizados en el año 2013.

Alelos	L	CMTm 103	CMTm 186	CMT m42	CMTm C11	CMTm C52	CMTm 25	CMTm 229	CMTm 39	CMTm 165	CMTm 243	CMTm 211	CMTm 232	CMTm C3	CMTm C37	
	A	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	-0.8261	*	*
	B													-0.8261		
	TOT	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	-0.8261	*	*

Tabla 19: Frecuencias alélicas encontradas en la población conjunta de las muestras colectadas en el año 2008 y 2013.

Alelos	L	CMTm 103	CMTm 186	CMT m42	CMTm C11	CMTm C52	CMTm 25	CMTm 229	CMTm 39	CMTm 165	CMTm 243	CMTm 211	CMTm 232	CMTm C3	CMTm C37	
	A	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	-0.6063	1	*
	B													-0.6063	1	
	TOT	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	-0.6063	1	*

4.4 DISCUSIONES ADICIONALES

De los índices de diversidad obtenidos en los años 2008 – 2013 se infiere que la diversidad genética del Loche de Lambayeque es muy baja. Entre las posibles causas que determinan esa pobre diversidad, estarían diversos factores genéticos y no genéticos; como las parcelas pequeñas y el sembrío en camas a distanciamientos de 3.0 m x 3.0 m o hasta 4.0 m. Por lo que se utilizan pocos individuos por hectárea; y, esto produce deriva génica. Por otro lado, el manejo de la semilla asexual influye mucho, ya que los mismos agricultores intercambian sus esquejes, por lo que se trata del mismo material vegetal que está rotando en las parcelas de los agricultores. Por lo tanto, se trata de una población muy homogénea, casi un clon.

Desde el punto de vista genético, Arbizu et al (2010) sugiere que los resultados de baja diversidad en sus muestras de Loche de Lambayeque se deben a la forma de propagación del Loche por esquejes y el celo de los agricultores por la semilla vegetativa, lo que limitaría la reproducción sexual del cultivo y por tanto la recombinación de los alelos. Este manejo del Loche también ha sido mencionado ampliamente en la revisión de la literatura anteriormente.

Sin embargo, se debe tomar en cuenta que en el caso de plantas que se propagan asexualmente también existen fuentes de variación genética como lo son las mutaciones somáticas o las variaciones epigenéticas (cambios heredables en la expresión génica que no implican cambios en la secuencia de ADN, como la metilación de citocinas, modificación de histonas y micro y pequeños ARNs de interferencia) (McKey et al, 2010).

Según McKey et al (2010) la variación epigenética heredable ha sido observada fenotípicamente en diversas colecciones de plantas propagadas asexualmente que difícilmente mostraban algún polimorfismo usando marcadores AFLPs o microsatélites como en el caso señalado por Noyer et al (2005) quien analizó con AFLPs y microsatélites muestras de plátano y obtuvo un resultado que confirmaba el origen de las mismas de una sola semilla y su propagación por semilla vegetativa, sin embargo, al analizar las mismas muestras usando la técnica MSAP (Methyl-Sensitive Amplification Polymorphism) encontró polimorfismos que le permitieron la clasificación de hasta tres grupos diferentes de las mismas muestras.

En ese sentido, lo afirmado por Arbizu et al (2010) sobre la falta de recombinación genética que influye en la baja diversidad encontrada mediante microsatélites, puede ser perfectamente factible, pero es importante recalcar que no indica que el cultivo de Loche no tenga diversidad a nivel epigenético, lo que explicaría la diversidad de formas y tamaños en

los frutos a pesar de la aparente homogeneidad en el sabor y aroma que recalcan los agricultores de Loche. A pesar de ello, aunque se pueden obtener relativa variación fenotípica mediante mutaciones somáticas o epigenéticas, la erosión genética no se puede combatir usando sólo propagación vegetativa (McKey et al, 2010).

En el aspecto social, según Pardey y García (2011) la diversidad genética de los cultivos nativos suele verse amenazada por la agricultura industrial debido al reemplazo de estos cultivos por especies mejoradas genéticamente con reducida diversidad, así como por la disminución de las áreas de cultivo. Cuando las poblaciones son pequeñas son más susceptibles a acumular mutaciones deletéreas, además de disminuir la variabilidad disponible, haciendo la selección natural menos eficiente (Rocha y Gasca, 2007). Esta erosión de la diversidad genética se hace presente como desventaja cuando el cultivo se ve vulnerable al ataque de plagas y enfermedades, así como a fenómenos naturales de efectos catastróficos para la agricultura, como el Fenómeno del niño, fenómeno que afecta fuertemente la costa norte del Perú como se describirá más adelante.

Al respecto sobre la influencia del mercado, Hilma et al (2011) observaron que sus resultados de baja diversidad genética obtenidos en muestras de *C. moschata* colectadas en Brasil se debían al desplazo del cultivo de las cucúrbitas tradicionales por cultivos industriales, al ser los cultivos de calabazas una actividad de agricultores asociados en familias, que intercambiaban semillas constantemente y que eran fuertemente presionados por la selección de patrones uniformes que exige el mercado.

Esta observación ha sido documentada en el cultivo de Loche y mencionada en la descripción inicial del cultivo en este documento. Adicionalmente, cuando Hilma et al (2011) habla de cultivos tradicionales se debe considerar los estudios de Velásquez-Milla et al (2016) que se analiza como la discriminación cultural, muy presente en el Perú, se puede considerar como un factor en la pérdida de diversidad ya que puede influir a la pérdida de costumbres, patrones de alimentación y patrones de uso de los recursos naturales, que a su vez influye en la dedicación a los cultivos tradicionales y su preservación.

Revisando la historia del Loche, según Moreano (2013) a pesar de que el Loche es considerado un cultivo de gran importancia para las culturas precolombinas, durante el periodo colonial y republicano del Perú, el Loche se mantuvo como un cultivo de huerta, sembrado solo para uso doméstico debido a la mayor dedicación a los cultivos industriales como la caña de azúcar y el algodón. Es recién a finales del siglo XX, con el incremento de

la población urbana local de Chiclayo, que se incrementa la demanda por este producto. Actualmente la mayoría de agricultores especializados señalan al poblado de Illimo como el centro de especialización y el lugar más reciente de origen de la semilla usada en las diversas zonas de cultivo.

El Loche como cultivo para uso doméstico antes de los 40s se mantuvo en los pueblos costeros de Eten y Monsefú, para luego ser llevado al centro de Lambayeque, que vendría a ser Illimo, y sería este distrito el semillero permanente, como se confirma en el siguiente párrafo que tiene como fuente las entrevistas que realizó Moreano (2013) a agricultores de Lambayeque sobre el cultivo de Loche:

“Según Manuel Garcia Llauce, productor de la zona, en 1945 ya había al menos 5 familias que sembraban Loche en Illimo. Varias personas, coinciden en que el Loche fue sembrado por primera vez en Illimo por algún miembro de la familia García (Maximiliano o Bernabe) con semillas provenientes de Monsefu, para luego difundirse entre familiares, amigos y vecinos.” (Moreano, 2013).

Aparentemente hubo un aislamiento genético en Illimo donde se concentró la producción de Loche hasta finales de los 80 durante décadas hasta que recién a finales de los años 90s, con el incremento de la población urbana local de Chiclayo, se incrementa la demanda por este producto y se inicia un período de difusión que lleva al cultivo a nuevas localidades tanto dentro y fuera de Lambayeque (Pítipo, Pomae III, y Bagua), pero siempre con semilla proveniente de Illimo (Moreano, 2013).

En la actualidad, en el caserío Pomae III perteneciente a Pítipo, se siembra Loche desde 1989, con semilla proveniente de Illimo, y concentra un máximo de 15 agricultores de Loche. Las tierras de cultivo fueron obtenidas por invasiones al bosque de Pomac durante los 80s por lo que disfrutaban de extensiones grandes donde sembrar Loche y un mayor nivel de tecnificación en su cultivo, actividad que ya está llevando actualmente al menos dos generaciones (Moreano, 2016; Aimi y Perassi, 2015). Esta difusión reciente, por tanto, tiene aproximadamente solo 30 años comparando con las fechas en que realizaron los estudios genéticos que se mencionan en este estudio.

Además de la presión del mercado por un producto más homogéneo, y los factores socioculturales que afectan a los cultivos nativos, existen otros factores que pueden influir en la disminución de diversidad de un cultivo cualesquiera. Según Moreano (2013) entre las razones por las que el Loche no se sembró en mayor cantidad en otras zonas de Lambayeque

se debería no sólo a la pérdida de semilla por discontinuación del cultivo o la ampliación de áreas de siembra de otros cultivos industriales, sino también a factores climáticos como el Fenómeno del Niño.

En el caso de Lambayeque, de hecho, la agricultura ha sido siempre duramente afectada durante los diversos fenómenos meteorológicos que ocurren en nuestro país, como en el fenómeno del niño en los años de 1891 y 1925, clasificado como intenso, y en los años 1983 y 1998, clasificados como extremadamente intenso. En estas ocasiones se suelen presentar abundantes lluvias que junto a los desbordes y la mala infraestructura de riego en los campos agrícolas provocan inundaciones y pérdida de grandes áreas de cultivo (INDECI, 2004).

Como se ha mencionado, las poblaciones pequeñas se ven más susceptibles a los factores estocásticos, como son los cambios climáticos radicales, los cuales aceleran su decline y los llevan a los llamados vórtices de extinción (las poblaciones pequeñas se vuelven más pequeñas por retroalimentación negativa debido a los efectos de la baja diversidad genética) (Rocha y Gasca, 2007).

El efecto de los fenómenos climáticos en la pérdida de diversidad de cultivos tradicionales en el Perú ha sido analizado por Velásquez-Milla et al (2016) mencionando que según las familias agricultoras peruanas de tuberosas nativas, entre los factores que amenazan la preservación de variedades tradicionales a pesar del esfuerzo de estas familias, destacan: las plagas, el cambio climático y la degradación de las áreas de cultivo y en concordancia con esta percepción, Felipe (2004) encontró que la ocurrencia de cambios en el clima durante el período de 2002 a 2004 determinaron la pérdida de variedades tradicionales de tuberosas nativas en comunidades campesinas de Cajamarca debido a que las heladas provocaron pérdidas de áreas de cultivo y luego el incremento de temperatura favoreció la incidencia de plagas.

Todos los factores mencionados (propagación clonal, presión de mercados, fenómenos climáticos) continúan ocurriendo en la región, retroalimentando la disminución de la diversidad de los cultivos de Loche. La baja diversidad del Loche implica peligros y susceptibilidad a plagas por las cuales los cultivos requieren cuidados especiales. Lamentablemente, existe poca difusión del Loche a nivel nacional y pocos agricultores conocen su manejo, a pesar de que el Loche no se cultiva tan sólo por la rentabilidad, sino más bien por el carácter tradicional y cultural que conlleva (Cairati, 2015; Barboza, 2017; Moreano, 2013).

Tanto su valor cultural, su importancia para los agricultores locales y el peligro que conlleva su aparente poca diversidad genética son razones para fomentar la reevaluación de este cultivo y la búsqueda de formas de incrementar su productividad y diversidad para beneficio de los agricultores lambayecanos, por medio de técnicas de mejoramiento que no arriesguen el acervo cultural y las condiciones que lo caracterizan.

V. CONCLUSIONES

- El análisis de diversidad genética con marcadores microsatélites da como resultado una muy baja diversidad genética en el cultivo de Loche de Lambayeque. Este resultado es consecuente con estudios anteriores y se confirma a lo largo de los años, así como se confirma también una disminución de la misma al comparar los índices obtenidos con muestras del año 2008 y 2013.
- La baja diversidad genética del Loche de Lambayeque obtenida mediante marcadores microsatélites, y la disminución de la misma con los años puede ser explicada por la presión de selección del mercado que busca productos homogéneos, pero también por factores ambientales e históricos.
- La baja diversidad genética del Loche de Lambayeque obtenida mediante marcadores microsatélites no indica que no se puede hallar mayor diversidad mediante el uso de otro tipo de marcadores o técnicas, como los marcadores AFLPs, que nos pueden brindar una mayor sensibilidad a la diversidad genética.

VI. RECOMENDACIONES

- Para obtener ADN de buena calidad y de forma segura, se recomienda hacer uso de kit de extracción para plantas con modificaciones para el género de interés.
- Analizar los cultivos de Loche con otro tipo de marcadores o técnicas, como, por ejemplo, el uso de marcadores AFLPs (Polimorfismo de longitud de fragmentos amplificados) o técnicas tipo MSAP (Polimorfismos de amplificación sensitivos a metilación).
- Se recomienda el incentivo de las campañas para la revaloración, estudio y protección del Loche por su carácter de cultivo emblemático de Lambayeque al ser importante a nivel histórico y sociocultural para la región.
- Se recomienda hacer estudios sobre mejoramiento de Loche sin poner en riesgo su acervo cultural y las condiciones que lo caracterizan por la importancia que guarda con la identidad de los pobladores de Lambayeque. Una forma de proteger biodiversidad es por medio de la preservación de germoplasma lo cual se puede hacer en bancos de cultivo in vitro. A su vez, el cultivo in vitro, también puede ayudar al mejoramiento por medio de técnicas de micropropagación (propagación de plantas en un ambiente artificial controlado) (Galdeano et al; s. f.)

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Arbizu C., Blas R. & Ugás R. (2010). Genetic diversity of Loche (*Cucurbita moschata* Duchesne ex Lam.) cultivated in Lambayeque, Peru assessed with SSR markers. En: Primer congreso peruano de mejoramiento genético y biotecnología agrícola (Proceeding). La Molina, Lima - Peru. 147 p.
- Bazo S, I., Espejo J, ., Palomino A, C., Flores P, M., Chang L, M., López B, C., & Mansilla S, R.. (2018). Estudios de biología floral, reproductiva y visitantes florales en el "Loche" de Lambayeque (*Cucurbita moschata* DUCHESNE). *Ecología Aplicada*, 17(2), 191-205. Doi: <https://dx.doi.org/10.21704/rea.v17i2.1239>
- Barboza C. (2017). Promoción del Loche lambayecano para su uso turístico en el caserío de Poma III – Pitipo. *Revista Científica Horizonte Empresarial*. Vol. 4, Núm. 1. Recuperado de: <http://revistas.uss.edu.pe/index.php/EMP/article/view/514/490>.
- Bisognin, D. A. (2002). Origin and evolution of cultivated cucurbits. *Ciência Rural*, v32 (4): 715-723
- Brown, R. (2001). The Use and Development of Molecular Breeding Tools in Cucurbita: A Literature Review. *Cucurbit Genet: Coop. Rep.* 24:87-90
- Brown, T. (2008). *Genomas*. 3º edición. Buenos Aires, Argentina. Médica Panamericana. 760p.
- Cairati, E. (2015). Tierra e Identidad en Lambayeque: fecundidad agro-cultural en el Bosque de Pómac entre pasado y presente. En: Aimi A. Y Perassi E. (eds). *Herencia Muchik en el Bosque de Pómac*. Ledizioni Milano, pp. 196. Recuperado de: https://air.unimi.it/retrieve/handle/2434/290002/418839/HERENCIA-MUCHIK_web.pdf

- Cañar S., D.Y.; (2012). Formación de un banco de ADN en la especie *Cucurbita moschata* (Duchesne ex lam.) Duchesne ex Poir y evaluación de ocho marcadores moleculares como código de barras para su autenticación. Tesis de Maestría. Palmira – Colombia. Universidad Nacional De Colombia, Facultad De Ciencias Agropecuarias, Coordinación General De Postgrados Palmira. 90 p.
- Cerón, L., Legaria, J.P., Villanueva, C., & Sahagun, J. (2010). Diversidad genética en cuatro especies mexicanas de calabaza (*Cucurbita spp.*). Revista Fitotecnia Mexicana, v33 (3): 189-196.
- Chambers, G., & Macavoy, E. (2000). Microsatellites: consensus and controversy. Comparative Biochemistry and Physiology, Parte B 126: 455-476.
- Crisci, J., & López, M. (1983). Introducción a la teoría y práctica de la Taxonomía Numérica. Washington, D.C.: Secretaria General de La Organización de los Estados Americanos (OEA) - Programa Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico. Serie n°26.
- Díaz, A. (1957). Estudio de las variedades nacionales de zapallo. Tesis para Ingeniero Agrónomo. Lima, Perú. Universidad Nacional Agraria La Molina.
- Divan, A., & Royds, J. (eds). (2013). Tools and Techniques in Biomolecular Science. London, UK: Oxford University Press. 528p.
- Doyle, J. J., & Doyle, J. L. (1990). Isolation of DNA from small amounts of plant tissues. BRL Focus. 12: 13-15.
- Eduarne, M., Bellacomo, C., Sidoti, B., & Della, P. (2013). Caracterización de las variedades e híbridos de zapallo anquito utilizados en las regiones del país. En: P. Della Gaspera (Ed.).Manual del cultivo del zapallo Anquito (*Cucurbita moschata* Duch.).San Carlos, Mendoza, Argentina. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA).344p.
- Eguiarte, L., Souza, V. & Aguirre, X. (Comp). (2007). Ecología molecular. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. Instituto Nacional de Ecología. Universidad Nacional Autónoma de México. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Tlalpan, México, D.F

- Felipe, L. (2004). Evolución del clima en el proyecto in situ. Proyecto conservación in situ de cultivos nativos y sus parientes silvestres, Lima. Recuperado de: <http://www.ccta.org.pe/uploads/publicaciones/0476493001321188623.pdf>
- Ferreira, M., & Grattapaglia, D. (1998). Introducción al uso de marcadores moleculares en el análisis genético. Brasilia. EMBRAPA - CENARGEN. 218p
- Ferriol, M., Pico, B., Fernandez De Cordova, P. & Nuez, F. (2004). Molecular Diversity of a Germplasm Collection of Squash (*Cucurbita moschata*) Determined by SRAP and AFLP Markers. *Plant genetic resources*. España. Published in *Crop Sci.* 44:653–664.
- Fonseca M., D., Mateus A., H. & Contreras B., N. (2010). *Prácticas de Laboratorio de Biología Molecular: Su Aplicación en Genética Básica*. Universidad del Rosario. 69 páginas.
- Galdeano, E., Luciani, G. & Olmos, S. (s. f.) IV. Capítulo: Micropropagación. En Levitus, Echenique, Rubinstein, Hopp y Mroginski (Eds). *Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II*. ArgenBio. Consejo Argentino para la Información y el Desarrollo de la Biotecnología. Ediciones INTA: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Consultado el 15 de Noviembre del 2018. Recuperado de: https://www.agroindustria.gob.ar/sitio/areas/escuelagro/_archivos//000011_INTA%20Biotecnologia/000000_Inta%20-%20B%C3%ADotecnolog%C3%ADa.pdf
- Giraldo G., G. A., Mejía, D., C. M. & Loango C., N. (2010). *Laboratorio de Bioquímica: Una Visión Práctica*. ELIZCOM
- Gliessman, S. R. (2002). *Agroecología: procesos ecológicos en agricultura sostenible*. Turrialba, Costa Rica: CATIE. 359p.
- Gong, L., Stift, G., Kofler, R., Pachner, M., Achner, R., & Lelley, T. (2008). Microsatellites for the genus *Cucurbita* and an SSR-based genetic linkage map of *Cucurbita pepo* L. *Theoretical and Applied Genetics*. 117 (1): 37–48.
- Gonzales G., E. (2003). Microsatélites: sus aplicaciones en la conservación de la biodiversidad. *Graellsia*, 59(2-3): 377-388
- Henderson, C.D., & Yapias, E.E. (2014). Determinación de la cantidad de polifenoles y su actividad antioxidante en el zapallo Loche (*Cucurbita moschata* Duchesne) fresco, sancochado y frito procedente del departamento de Lambayeque. Tesis para

- Licenciado en Nutrición y dietética. Lima, Perú. Universidad Peruana de Ciencias Aplicadas. 38p.
- Hernández-Baños, B., Honey-Escandón, M., Cortés-Rodríguez, M. & García Deras, G. (2007). Capítulo 15: Filogeografía de aves mexicanas. In Eguiarte, L; Souza, V; Aguirre, X. (Comp). Ecología molecular. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. Instituto Nacional de Ecología. Universidad Nacional Autónoma de México. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Tlalpan, México, D.F
- Lira, R. (1995). Estudios Taxonómicos y Ecogeográficos de las Cucurbitaceae Latinoamericanas de Importancia Económica: Cucurbita, Sechium, Sicana y Cyclanthera. Systematic and Ecogeographic Studies on Crop Gene Pools (9). International Plant Genetic Resources Institute. Rome, Italy. 281p.
- Lira, R., & Montes, S. (1992). Capítulo: La agricultura en Mesoamerica – Cucurbitas(Cucurbita spp.). En J. E. Hernández B. & J. León. (eds.), Cultivos Marginados. Otra perspectiva de 1492. Colección FAO: Producción y Protección Vegetal No. 26. Roma, Italia. pp. 61-75
- Loo, J.A. (2011). Manual de genética de la conservación. Principios aplicados de genética para la conservación. Mexico. Comisión Nacional Forestal (CONAFOR). 192 p.
- López B., C., Espejo, R. & Mansilla, R. (2014) El Loche (*Cucurbita moschata* Duchesne ex Lam.) su historia, cultivo, características agroclimáticas, genéticas y composición del fruto. Fondo Editorial – UNALM. Lima. 128p.
- Mckey, D., Elias, M., Pujol, B. & Duputie, A. (2010). The evolutionary ecology of clonally propagated domesticated plants. *New Phytologist* 186: 318–332
- Moreano Q., J. (2013). Caracterización agronómica del Loche (*Cucurbita moschata* Duch.) en Lambayeque. Tesis para la obtención del título de Ingeniero Agrónomo, Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima (Peru). Facultad de Agronomía.
- Noyer, J.I., Causse, S., Tomekpe, K., Bouet, A. & Baurens F.C. (2005). A new Image of plantain diversity assessed by SSR, AFLP and MSAP markers. *Genetica* 124: 61–69.

- P.E.CHAVIMOCHIC. (2009). Zapallo Loche, cultivo alternativo en Chavimochic. Trujillo, Perú. Boletín del Proyecto Especial Chavimochic N° 64, Año VIII. Oficina de relaciones Públicas. 4 p.
- Palomino, C. (2014). Evaluación de la diversidad genética del café (*Coffea arabica L.*) en Villa Rica (Perú). Ecol. apl. [online]. 2014, vol.13, n.2, pp. 129-134. Consultado el 02 de noviembre del 2017. Recuperado de:
http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-22162014000200007&lng=es&nrm=iso>. ISSN 1726-2216.
- Pardey R., C. & Garcia D., M.A. (2011). Caracterización molecular de 135 introducciones de *Capsicum* procedentes del banco de germoplasma de la Universidad Nacional De Colombia Sede Palmira. Revista del Instituto de Investigaciones Tropicales 6 21 - 32. Santa Marta, Colombia, Diciembre.
- Phillips - Mora, W., Rodriguez, H., & Fritz, P.J. (1995). Marcadores de ADN: Teoría, Aplicaciones y Protocolos de Trabajo. Con ejemplos de investigaciones en Cacao (*Theobroma cacao*). Turrialba, Costa Rica: Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE) 184p.
- Picó S., M.B. & Esteras G., C. (2012). Marcadores moleculares basados en PCR: Marcadores SSR o STR (Simple Sequence Repeats o Short Tandem Repeats). Microsatélites. Departamento Departamento de Biotecnología. Centro Universitat Politècnica de València. Consultado el 02-07-17 en <http://hdl.handle.net/10251/16743>.
- PROPOMAC. (2012). Loche de Lambayeque - Manual de Cultivo. Proyecto desarrollo de Capacidades de Comunidades en el Marco de la Agroindustria, Investigación Arqueológica y del Turismo Sostenible. Chiclayo, Perú. Cáritas Chiclayo. 48 p.
- Restrepo S, Javier A.; Vallejo C. & Franco A. (2008). Caracterización molecular de introducciones colombianas de zapallo Cucurbita moschata. Universidad Nacional de Colombia. Acta Agronómica, vol. 57, núm. 1, pp. 9-17.
- Reynolds, M., Pask, A., Mullan, D., & Chávez, P. (Edits.). (2013). Fitomejoramiento fisiológico I: enfoques interdisciplinarios para mejorar la adaptación del cultivo. Mexico D.F. Centro Internacional de Mejoramiento del Trigo - CIMMYT. 174 p.
- Rocha M. & Gasca J. (2007). Capítulo 8: Ecología molecular de la conservación. In Eguiarte, L; Souza, V; Aguirre, X. (Comp). Ecología molecular. Secretaría de Medio

Ambiente y Recursos Naturales. Instituto Nacional de Ecología. Universidad Nacional Autónoma de México. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Tlalpan, México, D.F

- Rojas, S., García, J., & Alarcón, M. (2004). Propagación Asexual de Plants: Conceptos básicos y experiencias con especies amazónicas. Bogotá, Colombia. CORPOICA / PRONATA / MADR. Produmedios. 55 p.
- Santos, M.H., Rodrigues, R, Azeredo, R., Pombo, C. & Gonzaga, M. (2012). Agrobiodiversity in Cucurbita spp. landraces collected in Rio de Janeiro assessed by molecular markers. Brazilian Society of Plant Breeding. Crop Breeding and Applied Biotechnology 12: 96-103.
- Singh, A.K. 1979. Cucurbitaceae and polyploidy. Cytology, v.44, p.897-905.
- Saghai-Marooif, M.A, Soliman, K.M., Jorgensen, R.A. & Allard, R.W. (1984). Ribosomal DNasepacer-length polymorphism in barley: mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. Proc Natl Acad Sci. 1984;81:8014–8019
- Ugás, R., Bustamante, F., & Andres, T. (2006). A unique pre-Columbian squash locally grown in North Coastal Peru. En: G. J. Holmes (Ed). Proceedings of Cucurbitaceae, 333-340.
- Ugás, R., Casas, A., Siura, S., Delgado De La Flor, F., & Toleda, J. (2000). Hortalizas, Datos Básicos. Lima, Perú. Universidad nacional Agraria La molina: Programa de Hortalizas. 202 p.
- Valdemar, M. D. (2006). Las cucurbitáceas: bases para su mejora genética. Horticultura Internacional 53: 16-21.
- Vasquez N., L. (2016). “el Loche producto emblemático de Lambayeque”. Consultado el 11 de noviembre del 2016. Recuperado de: <http://leovanu.blogspot.pe/2016/02/el-Loche-producto-emblematico-de.html>
- Velásquez-Milla, D., Casas, A., Torres-Guevara, J. & Cruz-Soriano, A. (2016). Erosión genética en comunidades andinas tradicionales. Factores ecológicos y socioculturales que influyen en la pérdida y conservación de agrobiodiversidad. En: A. Casas, J. Torres-Guevara, F. Parra (Eds). Domesticación en el continente americano Vol. 1, Edition: 1. UNAM/UNALM.

- Vicente, M.C., López, C. & Fulton, T. (eds.). (2004). Análisis de la Diversidad Genética Utilizando Datos de Marcadores Moleculares: Módulo de Aprendizaje. Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos (IPGRI), Roma, Italia. Consultado el 3 de Julio del 2017. Recuperado de: <http://www.bioversityinternational.org/e-library/publications/detail/modulos-de-aprendizaje-sobre-marcadores-moleculares-vol-1-y-2/>
- Viljoen, G., Nel L. & Crowther J. (2005). Molecular Diagnostic PCR Handbook. Springer Science & Business Media.
- Whitaker, T.W., & Bemis, W.P. (1975). Origen and Evolution of the Cultivated Cucurbita. Bulletin of the Torrey Botanical Club, 102 (6).
- Whitaker, T.W. (1968), Ecological aspects of the cultivated Cucurbita. HortScience, Vol. 3, No. 1, pp. 9-11.
- Wilches, A. (2004). Descripción de las herramientas moleculares y sus aplicaciones en la agricultura. Universidad Rafael Landívar (Guatemala). Instituto de Agricultura, Recursos Naturales y Ambiente. Serie técnica No. 15. 25 p.
- Zaccari, F (2005). Morfología de las Cucurbitáceas. Área Disciplinaria Poscosecha. Presentación en power point.[Online]. CRS, 2005. Consultado el 23 de Setiembre del 2016. Recuperado de: <http://documents.mx/documents/cucurbitaceas-introduccion-fisiologia.html>

VIII. ANEXOS

Anexo 1: BUFFER DE LISIS PARA EXTRACCION – CTAB (*AppliChem*)

Ingredientes y cantidades para la preparacion de 500ml.

Componentes	Para 500 ml	Concentración final
CTAB	10,00 g	(2% W/V)
Cloruro de Sodio	40,91 g	1,4 M
Tris Ultrapuro	6,055 g	100 mM
EDTA-Na ₂ -2H ₂ O	3,72 g	20 mM
Ácido clorhídrico	18,23 g	1M

Anexo 2: BUFFER TBE 10 X

Ingredientes y cantidades para la preparacion de 1L.

Componentes del Buffer TBE 10 X	Para 1 Litro
Trizma Base	108 g
Acido Bórico	55 g
EDTA 0,5M pH 8,0	40 ml

Anexo 3: SOLUCIÓN ADHERENTE

Ingredientes y cantidades para la preparación de una alicuota suficiente para cubrir un vidrio de 30x40cm aproximadamente.

- 7.5 ul de Bind Xilane
- 7.5 ul de ácido acético glacial
- 1.5 ml de alcohol al 95%

Anexo 4: ENSAMBLAJE Y PREPARACIÓN DEL GEL DE POLIACRILAMIDA AL 6%

1. Colocar espaciadores laterales sobre el vidrio con repelente. Sobre estas colocar el vidrio con adherente de manera que los lados tratados estén frente a frente.
2. Asegurar las esquinas y los puntos medios del sistema con abrazaderas metálicas que ejerzan igual presión en ambos lados.
3. Tomar un volumen de 60 ml de solución de poliacrilamida, adicionar 38 ul de TEMED y 380 ul de Persulfato de amonio al 10%, agitar suavemente.
4. Verter la solución a la placa de gel ensamblada, de manera continua para evitar la formación de burbujas de aire
5. Colocar un peine del mismo grosor de los separadores usados para la formación de los posillos.
6. Dejar polimerizar el gel por lo menos 2 horas.
7. Precorrida y cargado del gel de poliacrilamida
8. Luego del tiempo esperado retirar los peines y lavar los residuos de acrilamida en el gel formado. Llevar a la cámara electroforética; y con la ayuda de una jeringa hipodérmica retirar las burbujas de la parte superior e inferior del gel y precorrer a un voltaje 1600 voltios por espacio de 20 minutos. En este tiempo se aprovecha para adicionar los 5 ul de DYE a las muestras amplificadas, y llevarlas a denaturar por 5 minutos.
9. Una vez precorrido el gel, cargar las muestras ya denaturadas.

Anexo 5: TINCION CON NITRATO DE PLATA

Para la solución de **FIJACION DEL GEL**

Ácido acético 5ml

Etanol Absoluto 100ml

H₂O destilada 900ml

Agitar por espacio de 20 minutos.

TINCION DEL GEL

Nitrato de plata 2gr

H₂O destilada 1000ml

Agitar por espacio de 20 minutos.

REVELADO DEL GEL

Hidróxido de sodio 24gr

H₂O destilada 800ml

Agitar por espacio de 20 minutos.

Agregar solo antes de usar:

Formaldehido 5ml

Agitar brevemente.