

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

E.A.P. DE GENÉTICA Y BIOTECNOLOGÍA

**Caracterización molecular de las variedades de papas cultivadas
(*Solanum spp.*) más importantes del Perú mediante el uso de
microsatélites**

TESIS

Para optar el Título Profesional de Biólogo Genetista Biotecnólogo

AUTOR

Reynaldo Ponce Almeri

ASESORES

María del Rosario Herrera Montoya

Pablo Ramírez Roca

Lima – Perú

2013

*A mis padres, los pilares
más importantes de mi vida*

AGRADECIMIENTOS

Ha pasado mucho tiempo desde que empecé con esta investigación y lo primero que se me viene a la mente es agradecer a mis padres, Valerio y Amanda, por su amor, sacrificio y paciencia brindados durante todo este periodo, sin su apoyo incondicional no hubiera podido terminar con la redacción de esta tesis. Gracias mamá, por enseñarme siempre a perseverar en mis empresas y no bajar los ánimos ante ninguna adversidad. Gracias papá, por estar siempre allí apoyándome en todo y por tus sabios consejos, sé que pronto te recuperarás. Quiero también agradecer a mis hermanos Miguel y Daniel por sus muestras de afecto y cariño, en especial a Danielito por su compañía y confianza en los últimos años. Además, tengo que agradecer a toda mi familia por demostrarme su apoyo y cariño en las buenas y en las malas, siempre como una verdadera familia.

Quiero agradecer de manera muy especial a todo el equipo del laboratorio de “Marcadores Moleculares I”, por su invaluable ayuda. A Rosario Herrera, por su excelente asesoría y consejos pertinentes para la realización de mi tesis. A Laura Jara, “mi madre” en el CIP, por ser mi tutora y guía en el manejo de equipos y materiales del laboratorio, sin su ayuda no me hubiera podido adecuar tan rápido. A Juan Daniel Montenegro, por sus consejos y compañía, sin su presencia el laboratorio no hubiera sido tan ameno. Al técnico José Rodríguez, por la ayuda brindada durante todo el proceso experimental de mi tesis, sin él mi trabajo hubiera sido más laborioso y aburrido. Por último, a Luciano Fernández “Lucianito” por su enorme paciencia y ayuda en la corrida de mis geles de electroforesis.

De manera particular me gustaría agradecer a todos mis compañeros practicantes, tesisistas o asistentes de investigación de los diferentes laboratorios del CIP, por su grata compañía y amistad: Diana Días, Romina Reaño, Bruno Lértora, Kathy Prentice,

Milton Untiveros, Dora Quispe, Milagros Ormachea, Laura Sánchez, Roció Alarcón, Martin Requejo, Angie, Eliana, y Yuriko.

No quiero dejar pasar la ocasión para agradecer al Dr. Stef de Haan y a Jorge Núñez por su gran ayuda en el momento de la redacción de mi tesis. Gracias a sus sabios consejos y asesorías pude darle el sentido adecuado a este trabajo luego de algunas correcciones.

Asimismo, quiero agradecer al Profesor Pablo Ramírez, mi asesor interno, por todo su tiempo y dedicación en la corrección de mi tesis y además por su amistad. Al mismo tiempo agradezco a todos los miembros del jurado por su esmerada revisión.

Agradezco también a mis amigos de la Universidad Mayor de San Marcos de la Facultad de Ciencias Biológicas que me apoyaron mediante sus observaciones y consejos en la realización de mi tesis: Pedro Romero, Julián Soto, Ronald Robles, Diana Rojas y especialmente a Diógenes Cerna, que ahora descansa en paz.

Finalmente, quiero agradecer a mis amigos más cercanos: Luis Miguel, Juan Carlos, Luis Enrique, Kara, Cristian, Juan José, Jorge, Miguel, y Carla por su invaluable amistad, construida a lo largo de todos estos años, que me ha servido para desarrollarme como persona. Gracias totales.

ABREVIATURAS

AFLP	Amplified fragment length polymorphism (polimorfismo en la longitud de los fragmentos amplificados)
AMOVA	Analysis of molecular variance (análisis de varianza molecular)
ANOVA	Analysis of variance (análisis de varianza)
cm	Centímetro
CIP	Centro Internacional de la Papa
CTAB	Bromuro de cetil-trimetil-amonio
DNA	Deoxyribonucleic acid
dNTP	Desoxirribonucleótido
ddNTP	Didesoxirribonucleótido
EDTA	Etilen diamine tetra-acetic acid (ácido etilen-diamino-tetra acético)
FAO	Food and Agriculture Organization (Organización de las Naciones Unidas para la agricultura y la alimentación)
IPGRI	International Plant Genetic Resources Institute (instituto internacional de recursos genéticos vegetales)
mL	Mililitro
mg	Miligramo
mM	Milimolar
ng	Nanogramo
OMS	Organización Mundial de la Salud
PCR	Polymerase chain reaction (reacción en cadena de la polimerasa)
pvp	Polivinil pirrolidona
pb	Pares de bases
PGI-Kit	Potato Genetic Identity Kit (Kit de identificación genética de papa)
PIC	Polymorphic index content (índice de contenido polimórfico)
<i>Pst</i> I	<i>Providencia stuartii</i> , restricción endonucleasa

QTL	Quantitative trait loci (locus de caracteres cuantitativos)
rpm	Revoluciones por minuto
RFLP	Restriction Fragment Length Polimorphism (polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción)
RAPD	Ramdon Amplified Polymorphic DNA (DNA Polimórfico Amplificado al Azar)
SCRI	Scottish Crop Research Institute
SEINPA	Semilla e investigación en papa
SNP	Single Nucleotide Polimorphism (polimorfismo de un solo nucleótido)
SSR	Short Sequence Repeats (secuencias simples repetitivas)
STR	Short Tandem Repeat (repetición corta en tándem)
TA	Temperatura ambiente
TBE	Tris-Borato-EDTA
TEMED	N, N, N', N'-Tetra-metil etilen di-amina
UPGMA	Unweighted pair group method using arithmetic averages (método de agrupamiento por medias aritméticas no ponderadas)
UNMSM	Universidad Nacional Mayor de San Marcos
UV	Ultravioleta
α	Nivel de significancia
μg	Microgramo
μL	Microlitro
$^{\circ}\text{C}$	Grados Celsius

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	4
II.1. La papa (<i>Solanum</i> spp.)	4
II.1.1. Generalidades	4
II.1.2. Origen y domesticación de la papa cultivada	5
II.1.3. Aspectos evolutivos de las papas cultivadas	12
II.1.4. Clasificación taxonómica de la papa cultivada	17
II.2.1. Diversidad y variabilidad genética	18
II.2.2. Polimorfismo genético	19
II.2.3. Cuantificación de la diversidad genética	19
II.2.4. Estructuración y diferenciación genética poblacional	21
II.2.5. Factores que influyen en la diversidad y estructura genética	22
II.3. <i>Pool</i> genético	23
II.4. Mejoramiento genético de la papa	23
II.4.1. Recursos fitogenéticos como fuente de mejoramiento	23
II.4.2. Variedades mejoradas andinas	25
II.4.3. Variedades de papas nativas del Perú	26
II.4.4. Variedades de papa cultivada de mayor demanda en el Perú	28
II.5. Caracterización del germoplasma	28
II.6. Marcadores moleculares	30
II.6.1. RFLP	33
II.6.2. RAPD	34
II.6.3. SSR	34
II.6.4. AFLP	36
II.6.5. SNPs	37
II.7.1. Marcadores moleculares y microsatélites en papa	38
II.7.2. Set de microsatélites para la identificación genética de la papa	40
III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	42
III.1. Hipótesis	42
III.2. Objetivos	42
III.2.1. Objetivo general	42
III.2.2. Objetivos específicos	42
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	43
IV.1. Materiales	43

	Pág.
IV.1.1. Material biológico	43
IV.1.2. Enzimas y kits	43
IV.1.3. Software de análisis de datos	43
IV.2. Métodos	45
IV.2.1. Extracción de DNA	45
IV.2.2. Electroforesis en geles de agarosa del DNA extraído de las muestras	46
IV.2.3. Cuantificación de la concentración del DNA extraído de las muestras	47
IV.2.4. Dilución de la concentración de DNA de las muestras	47
IV.2.5. Preparación de los marcadores de tamaño estándar de cada SSR	47
IV.2.6. Amplificación de las regiones microsatélites	48
IV.2.6.1. Preparación del DNA templado	48
IV.2.6.2. Protocolo de amplificación	48
IV.2.6.3. Programa de amplificación	49
IV.2.6.4. Iniciadores SSR utilizados	49
IV.2.7. Electroforesis de los productos de amplificación	50
IV.2.8. Detección y registro de los patrones de bandeo	50
IV.2.9. Análisis de los resultados	52
IV.2.9.1. Determinación de la riqueza alélica	52
IV.2.9.2. Determinación de la Heterocigosidad esperada (He)	52
IV.2.9.3. Análisis de agrupamiento	53
IV.2.9.4. Análisis de varianza Molecular (AMOVA)	54
IV.2.9.5. Análisis estadístico de datos	56
V. RESULTADOS	57
V.1. Registro y caracterización de los 23 iniciadores microsatélites	57
V.1.1. Número de loci amplificados por iniciador	57
V.1.2. Alelos no reportados previamente	60
V.1.3. Alelos Nulos	61
V.1.4. Relación entre motivos repetidos y tamaño de alelos	62
V.1.5. Variedades que exceden la ploidia esperada	62
V.1.6. Variedades duplicadas según la caracterización con SSR	64
V.2. Análisis de la diversidad genética	64
V.2.1. Riqueza alélica	64
V.2.1.1. Riqueza alélica por región geográfica	64
V.2.1.2. Riqueza alélica de las variedades nativas y mejoradas	66
V.2.2. Alelos comunes y exclusivos	66

	Pág.
V.2.2.1. Alelos comunes y exclusivos de cada región	67
V.2.2.2. Alelos comunes y exclusivos de las variedades nativas y mejoradas	68
V.2.3. Heterocigosidad esperada	69
V.2.3.1 Heterocigosidad esperada por regiones	70
V.2.3.2. Heterocigosidad esperada por variedades nativas y mejoradas	70
V.3. Análisis de la Varianza Molecular	71
V.3.1. Agrupando por regiones: Norte, Centro y Sur	71
V.3.2. Agrupando por categorías: nativas y mejoradas	72
V.4. Análisis de agrupamiento	73
V.4.1. Dendrograma por identidad taxonómica y ploidia	74
V.4.2. Dendrograma por regiones geográficas: Norte, Centro y Sur	76
V.4.3. Dendrograma por variedades nativas y mejoradas	76
V.5. Análisis estadístico de datos	78
V.5.1. Análisis por regiones	79
V.5.2. Análisis por variedades nativas o mejoradas	81
VI. DISCUSIÓN	82
VI.1. Registro y caracterización de los 23 iniciadores microsatélites	82
VI.2. Análisis de la diversidad genética	86
VI.2.1. Riqueza alélica	86
VI.2.2. Heterocigosidad esperada	88
VI.3. Análisis de Varianza Molecular	90
VI.4. Análisis de agrupamiento	92
VII. CONCLUSIONES	99
VIII. RECOMENDACIONES	100
IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	101
X. ANEXOS	111
Anexo I. Preparación de reactivos	111
Anexo II. Lista de las 168 variedades de papas.	114
Anexo III. Evaluación de la calidad del DNA extraído de las muestras.	118
Anexo IV. Frecuencias alélicas por regiones y tipo de variedad.	120
Anexo V. Heterocigosidad de cada SSR por región y por tipo de variedad.	125
Anexo VI. Distribución del índice de disimilitud entre pares de variedades.	127
Anexo VII. AMOVA de las variedades entre regiones, tomado de a pares.	130

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Relaciones evolutivas de las papas cultivadas con sus ancestros silvestres y sus niveles de ploidia (Adaptado de Hawkes, 1990).	14
Figura 2. Distribución de especies diploides de papa cultivada (Hawkes, 1990).	15
Figura 3. Distribución de especies poliploides de papa cultivada (Hawkes, 1990).	16
Figura 4. Principales factores que influyen en los niveles de diversidad genética dentro de una población. Ne es el número de la población efectiva.	23
Figura 5. Motivos repetitivos y polimorfismo de los Microsatélites o SSR.	35
Figura 6. Ubicación geográfica de las variedades de papas cultivadas más importantes del Perú.	44
Figura 7. Patrón de bandas obtenido con el microsatélite STM1052 en el sistema LI-COR 4300. Los <i>ladders</i> "L" de tamaño estándar se posicionan cada 8 muestras. Se pueden apreciar dos loci diferenciados, siendo el segundo locus difuso por encima del locus principal.	57
Figura 8. Patrón de bandas obtenido con el microsatélite STM5121 en el sistema LI-COR 4300. En la imagen se aprecian alelos tenues y alelos intensos, lo que posiblemente se deba a dos loci sobrepuestos para este microsatélite, uno principal que produce alelos intensos y el secundario que produce alelos tenues.	59
Figura 9. Patrón de bandas obtenido con el microsatélite STI0030 en el sistema LI-COR 4300. Se indican los tamaños, en pares de bases, de los alelos pertenecientes a las primeras 32 muestras (variedades de papas). Los <i>ladders</i> "L" de tamaños estándar se posicionan cada 8 muestras.	60
Figura 10. Distribución y promedio de las Heterocigosidades de las regiones	70
Figura 11. Distribución y promedio de las Heterocigosidades según el tipo de variedad	71
Figura 12. Dendrograma de las variedades de papas cultivadas según su identidad taxonómica. La barra inferior es una representación a escala de la distancia genética.	75
Figura 13. Dendrograma de las variedades de papas cultivadas según su región de procedencia.	77
Figura 14. Dendrograma de las variedades de papas nativas y mejoradas cultivadas en el Perú. La flecha roja indica el clado principal de las variedades mejoradas ($2n = 4x$). Las variedades mejoradas CICA, Liberteña y Liberteña Cutervo se ubican fuera del clado principal de las variedades mejoradas.	78

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Especies de papa cultivada según el tratamiento taxonómico tradicional y moderno	5
Tabla 2. Valor nutricional de la papa cruda sin cocinar. Tomado de la base de datos del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA, 2011)	6
Tabla 3. Comparación del rendimiento y producción nutritiva por hectárea (Ha) de los principales cultivos. Tomado de la base de datos estadísticos de la FAO (FAOSTAT, 2013)	7
Tabla 4. Principales variedades mejoradas por el CIP y el Instituto de Investigación y Promoción Agropecuaria (INIPA). Tomado de Estrada (2000)	25
Tabla 5. Variedades de papas nativas de interés comercial en el Perú (Gómez <i>et al.</i> , 2008)	27
Tabla 6. Producción en toneladas de semilla básica de papa por variedad y región, campaña 1992-1993. Tomado de Catalogo de Semilla Básica de Papa en el Perú (SEINPA, 1994)	29
Tabla 7. Características relevantes de los principales marcadores. Boletín técnico número 10 del Instituto Internacional de Recursos Genéticos Vegetales (IPGRI, 2003).	32
Tabla 8. Protocolo estándar de amplificación de microsatélites	48
Tabla 9. Programa de amplificación de los SSR	49
Tabla 10. Iniciadores SSR del PGI Kit utilizados y algunas de sus características (Ghislain, 2008)	51
Tabla 11. Representación de los componentes que definen un AMOVA	56
Tabla 12. Número, tamaño y frecuencia de los alelos amplificados por cada microsatélite	58
Tabla 13. Alelos inéditos amplificados por microsatélite	61
Tabla 14. Variedades de papa que presentaron bandas tipo artefacto por microsatélite	61
Tabla 15. Variedades con presencia de alelos nulos por microsatélite	62
Tabla 16. Series alélicas de motivos repetidos por marcador SSR	63
Tabla 17. Variedades que exceden la ploidia esperada según la caracterización con microsatélites	63
Tabla 18. Variedades de papa que presentan haplotipos en común	65
Tabla 19. Riqueza alélica en papas por región geográfica de procedencia	66

	Pág.
Tabla 20. Comparación de la Riqueza alélica entre variedades mejoradas y nativas	67
Tabla 21. Alelos comunes y exclusivos por SSR para las regiones geográficas	68
Tabla 22. Alelos comunes y exclusivos por SSR entre las variedades nativas y mejoradas de papa	69
Tabla 23. Análisis de Varianza Molecular de las variedades de papas según su región de procedencia	72
Tabla 24. Análisis de Varianza Molecular entre las variedades de papas nativas y mejoradas	73
Tabla 25. Medias de las Heterocigosidades por regiones	79
Tabla 26. ANOVA (A) y comparación de He ³ medias (B) entre regiones	80
Tabla 27. Medias de las Heterocigosidades según el tipo de variedad	80
Tabla 28. Prueba de hipótesis entre las He ³ medias de variedades nativas y mejoradas	81

RESUMEN

La papa (*Solanum* spp.) es uno de los 4 cultivos alimenticios de mayor importancia en el mundo. La caracterización morfológica y molecular es útil para estudiar la diversidad de este cultivo. El presente trabajo se realizó en las instalaciones del Centro Internacional de la Papa con la finalidad de caracterizar molecularmente una colección de 168 variedades de papa cultivada, de interés socioeconómico en el Perú, mediante marcadores microsatélites.

Se extrajo DNA genómico de cada variedad a partir de sus hojas y por PCR se amplificaron 23 regiones microsatélites. Los fragmentos amplificados fueron cargados en geles de poliacrilamida para determinar su tamaño en pares de bases, obteniéndose así la caracterización molecular, y en base a ésta se analizó la diversidad genética, la varianza molecular (AMOVA) y el patrón de agrupamiento de las variedades en estudio. Dichos análisis se realizaron desde dos enfoques: por regiones (Norte, Centro y Sur) y por tipo de variedad (nativa y mejorada).

Se pudo caracterizar a las 168 variedades de papas con los 23 SSR. Se encontró la mayor diversidad genética en la región Sur; mientras que la mayor fuente de variación genética es interna entre las regiones, y la mayor variación genética interregional se dio entre Norte y Centro. Por otro lado, se apreció que las variedades nativas tienen una mayor diversidad genética que las mejoradas y la variación genética entre ellas es considerable. En el análisis de agrupamiento se observó una tendencia de las papas diploides a formar un grupo distinto al de las tetraploides y que las variedades mejoradas tienden a formar un grupo estructurado en el dendrograma. Estos resultados sugieren que la diversidad genética se mantiene entre las regiones, que las frecuencias alélicas de las variedades diploides se diferencian de las tetraploides y que la mayor fuente de variación genética poblacional es interna.

Palabras clave: *Solanum* spp, caracterización molecular, microsatélites, diversidad genética, AMOVA, análisis de agrupamiento.

ABSTRACT

Potato (*Solanum* spp.) is one of the four most important food crops in the world. The Morphological and molecular characterization is useful for studying the diversity of this crop. This work was performed at the facilities of the International Center of Potato in order to molecularly characterize a collection of 168 cultivated potato varieties, from socioeconomic interests in Peru, using microsatellite markers.

Genomic DNA was extracted from each variety leaves and were amplified by PCR 23 microsatellite regions. The amplified fragments were loaded onto polyacrylamide gels to determine its size in base pairs, thus obtaining the molecular characterization, and based on this we analyzed the genetic diversity, molecular variance (AMOVA) and the pattern of clustering of the varieties under study. These analyzes were conducted from two perspectives: by region (North, Central and South) and by category (native and improved).

It was possible to characterize the 168 varieties of potatoes with 23 SSR. We found the greatest genetic diversity in the South, while the highest genetic variation is inside regions, and the interregional greater genetic variation occurred between North and Center. Furthermore, it was found that native varieties have greater genetic diversity than improved and genetic variation between them is considerable. In the cluster analysis was showed that diploid potatoes have a tendency to form a group distinct from the tetraploid potatoes and improved varieties tend to form a structured group in the dendrogram. These results suggest that genetic diversity is maintained between the regions, the allele frequencies of diploid varieties differ from the tetraploid and that the major source of population genetic variation is internal.

Keywords: *Solanum* spp, molecular characterization, microsatellites, genetic diversity, AMOVA, cluster analysis.

I. INTRODUCCIÓN

La papa es cultivada a escala mundial y es el cuarto cultivo en producción alimenticia, después del maíz, el arroz y el trigo. Es el cultivo vegetal más productivo, además ocupa el primer lugar entre los tubérculos y las raíces a nivel mundial, seguido por la yuca y el camote. En el Perú ocupa el primer lugar en producción alimenticia (FAO, 2013).

Posee una enorme cantidad de recursos genéticos el cual se encuentra representado por unas 200 especies silvestres y 8 especies de papa cultivada según Huamán (1986) que incluye a *S. stenotomum*, *S. goniocalix*, *S. phureja*, *S. ajanhuiri*, *S. juzepczsukii*, *S. Chaucha*, *S. T tuberosum* y *S. curtilobum*. Según Spooner *et al.*, (2007) solo existen 4 especies de papa cultivada: *S. ajanhuiri*, *S. juzepczsukii*, *S. curtilobum* y *S. tuberosum*, esta última con dos grupos de cultivares (grupo Andigena y grupo Chilotanum).

Como todos los cultivos la papa es susceptible a pestes, plagas y enfermedades (factores bióticos); y a efectos climáticos adversos como sequías, heladas, suelos pobres y estrés salino (factores abióticos). Esta susceptibilidad disminuye su producción y trae graves consecuencias socioeconómicas como el hambre y malnutrición en regiones dependientes de este cultivo; así mismo causan la pérdida de su diversidad y variabilidad genética, proceso también conocido como erosión genética.

Ante esta situación, para mantener o aumentar el suministro mundial de este alimento, los programas de mejoramiento buscan introducir a los cultivares modernos la resistencia y tolerancia genética a estos factores bióticos y abióticos, mediante la incorporación de un rango mayor de diversidad genética que proviene básicamente de la cruce con cultivares tradicionales y/o especies silvestres filogenéticamente relacionadas. Estos cultivares son en conjunto la fuente más importante de recursos

genéticos y son resguardados a través de los programas de conservación *ex situ*, en los bancos de semillas y germoplasma (material genético transmisible dentro de una especie o variedad); e *in situ*, en sus ecosistemas y hábitats naturales (Ashkenazi *et al.*, 2001).

Es así que el Centro Internacional de la Papa (CIP) alberga una de las más grandes colecciones de papa del mundo, como un bien público mundial, bajo los auspicios del Tratado Internacional de las Naciones Unidas. El banco genético del CIP mantiene un poco más de 7,000 variedades de papas (2248 de las cuales son silvestres y 4,732 son variedades cultivadas nativas), con la finalidad de resguardar la mayor cantidad posible de recursos genéticos.

Por otro lado, el entendimiento de la diversidad genética de la papa nos permitirá manejarla, protegerla y utilizarla de la manera más óptima. De esta forma, los programas de conservación tendrán éxito en la identificación y manejo de los centros de origen de la diversidad genética; y mediante los programas de mejoramiento se podrán seleccionar las variedades más afines a partir de las cuales incorporar diversidad genética en los cultivares modernos, es decir llevar a cabo la introgresión de genes para caracteres importantes como la resistencia a factores bióticos y abióticos o caracteres que estén relacionados con una mayor productividad (Spooner *et al.*, 1998).

Para cumplir con dichas medidas es necesario primero conocer la descripción taxonómica, morfológica, fisiológica y genética de las especies que serán utilizadas en estos programas (Sevilla y Holle, 2004). En este sentido, el uso de técnicas moleculares para la caracterización genética del cultivo de la papa es de mucha importancia dada su alta especificidad. Entre los marcadores moleculares de DNA más destacados para la caracterización se encuentran los RFLP (Polimorfismo en la longitud de fragmentos de restricción), AFLP (Polimorfismo en la longitud de

fragmentos amplificados), RAPD (Amplificación polimórfica aleatoria de DNA), microsatélites o SSR (Secuencias simples repetitivas en tándem) y SNP (Polimorfismo de un solo nucleótido).

Los microsatélites, o SSR por sus siglas en inglés *short sequence repeats*, son marcadores moleculares altamente informativos para estudios de diversidad genética poblacional. Entre las bondades los SSR están las de ser marcadores codominantes, altamente polimórficos, distribuidos por todo el genoma (Ferreira y Grattapaglia, 1998), bajo costo una vez desarrollados, son sencillos de trabajar y altamente reproducibles. Por esta razón, en el presente trabajo se seleccionaron 23 de los 24 marcadores SSR del “PGI-Kit” (*Potato Genetic Identity Kit*), desarrollados en el CIP (Ghislain *et al.*, 2008), para la caracterización molecular de estas variedades de papas.

Esta investigación tuvo como objetivo principal la caracterización molecular de las variedades de papas cultivadas (*Solanum* spp.) de mayor importancia en área cultivada y consumo en el Perú, lo que a su vez servirá para analizar su diversidad genética, la variación genética dentro y fuera de las poblaciones, y los patrones de agrupamiento que puedan tener. Tales conocimientos permitirán darle un uso más adecuado a los recursos genéticos, tanto en los programas de conservación como en los de mejoramiento genético.

El presente trabajo de investigación se realizó en los Laboratorios de Biotecnología Aplicada del Departamento de Mejoramiento y Recursos Genéticos del CIP.

II. MARCO TEÓRICO

II.1. La papa (*Solanum* spp.)

II.1.1. Generalidades

La papa pertenece al género *Solanum* dentro de la familia de las solanáceas donde también se encuentran el tomate (*Lycopersicon esculentum*), el ají (*Capsicum* spp.), la petunia (*Petunia* spp.), el tamarillo (*Cyphomandra* spp.), el tabaco (*Nicotiana Tabacum*) y otras especies con bayas venenosas (Hawkes, 1992).

A su vez, el género *Solanum* alberga más de 2000 especies (Sevilla y Holle, 2004), la mayoría de las cuales son especies no tuberizantes como el pepino (*S. muricatum*), la berenjena (*S. melongena*), el naranjillo (*S. quitoense*), la mora negra (*S. nigrum*), y muchas malas hierbas y arbustos. Solo una parte reducida del género *Solanum* se encuentra conformado por especies que forman tubérculos o tuberizantes (sección *Petota*, subsección *Potatoe*) a las que se denomina papa.

Existen alrededor de 190 especies de papa silvestre taxonómicamente distintas (Spooner y Salas, 2006) las cuales poseen un número base de cromosomas ($x = 12$) y tienen una rango que varía desde diploides ($2n = 2x = 24$) hasta hexaploides ($2n = 6x = 72$) (Hawkes, 1994). Todas estas especies existen solo en América: crecen desde el sur de los Estados Unidos, a través de México, América Central, los países andinos, hasta el sur de Chile. Se encuentran desde el nivel del mar hasta más de 4 000 metros de altitud (Huamán, 1986).

Según la clasificación taxonómica tradicional adoptada por el CIP (Huamán, 1986) existen 8 especies de papa cultivada (tabla 1), que son: *S. stenotomum* (2x), *S. goniocalix* (2x), *S. phureja* (2x), *S. ajanhuiri* (2x), *S. juzepczsukii* (3x), *S. chaucha* (3x), *S. tuberosum* (4x) y *S. curtilobum* (5x). Sin embargo el último tratamiento taxonómico realizado por Spooner *et al.*, (2007) reclasifica a la papa cultivada en tan solo 4

especies: (i) *S. tuberosum*, con dos grupos de cultivares (grupo Andígena con variedades diploides, triploides y tetraploides de los altos Andes, y grupo Chilotanum con variedades tetraploides de las tierras bajas chilenas); (ii) *S. ajanhuiri* (diploide), (iii) *S. juzepczsukii* (triploide) y (iv) *S. curtilobum* (pentaploide).

Tabla 1. Especies de papa cultivada según el tratamiento taxonómico tradicional y moderno

Autor	Especies	Número de cromosomas	Nivel de ploidía
Huamán (1986)	<i>S. ajanhuiri</i> Juz. Et Buk. <i>S. goniocalix</i> <i>S. phureja</i> Juz. Et Buk. <i>S. stenotomum</i> Juz. Et Buk.	$2n = 2x = 24$	diploide
	<i>S. chaucha</i> Juz. Et Buk. <i>S. juzepczsukii</i> Buk.	$2n = 3x = 36$	triploide
	<i>S. tuberosum</i> L. spp. <i>andigena</i> spp. <i>tuberosum</i>	$2n = 4x = 48$	tetraploide
	<i>S. curtilobum</i> Juz. Et Buk.	$2n = 5x = 60$	pentaploide
	<i>S. ajanhuiri</i> Juz. Et Buk.	$2n = 2x = 24$	diploide
	<i>S. juzepczsukii</i> Buk.	$2n = 3x = 36$	triploide
	<i>S. Tuberosum</i> L. Grupo <i>Andígena</i>	$2n = 2x = 24$ $2n = 3x = 36$ $2n = 4x = 48$	diploide triploide tetraploide
Spooner (2007)	Grupo <i>Chilotanum</i>	$2n = 4x = 48$	tetraploide
	<i>S. curtilobum</i> Juz. Et Buk.	$2n = 5x = 60$	pentaploide

Por otro lado, se han calculado que hay aproximadamente unas 5000 variedades de papas cultivadas en el mundo, la mayoría de las cuales crecen principalmente en los Andes de Perú, Bolivia, Ecuador, Chile, y Colombia (Ochoa, 1999). Presentan un inmenso rango de formas, tamaños y colores, que van desde el blanco hasta el rojo y

negro. En el banco de germoplasma del CIP se encuentran resguardados cerca del 80 % de los cultivares nativos y 50 % de los parientes silvestres, sin embargo, el estatus de muchos otros todavía está en duda.

De todas las especies cultivadas solamente *S. t. tuberosum* (*S. tuberosum* Grupo Chilotanum) se encuentra mundialmente distribuida, debido a su adaptación a días largos, las demás están restringidas a los países andinos, principalmente adaptadas a días cortos, en donde se encuentran millares de cultivares nativos (Huamán, 1986).

Las propiedades nutricionales de la papa la hacen uno de los principales cultivos del mundo. Principalmente está compuesta de agua (75%); un alto contenido de carbohidratos (20%), representada básicamente por almidón y en menor cantidad por fibras dietéticas; proteínas (2%); una ínfima cantidad de grasas (0.01%); y una gran cantidad de micronutrientes como las vitaminas, minerales y antioxidantes (tabla 2).

Tabla 2. Valor nutricional de la papa cruda sin cocinar. Tomado de la base de datos del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA, 2011)

Valor nutricional por cada 100 g de papa cruda con cáscara	
Energía 80 Kcal (320 kJ)	
Carbohidratos	19 g
- Almidón	15 g
- Fibra dietética	2.5 g
Grasas	0.1 g
Proteínas	2 g
Agua	75 g
Tiamina (Vit. B1)	0.08 mg
Riboflavina (Vit. B2)	0.03 mg
Niacina (Vit. B3)	1.1 mg
Vitamina B6	0.25 mg
Vitamina C	20 mg
Calcio	12 mg
Hierro	1.8 mg
Magnesio	23 mg
Fósforo	57 mg
Potasio	421 mg
Sodio	6 mg

Adicionalmente la papa posee un rendimiento superior a muchos otros cultivos en cuanto a la producción de proteína y energía por unidad de tiempo y superficie (tabla 3). Su contenido proteico es particularmente valioso debido a su alto contenido de aminoácidos esenciales, lo que no es común en las proteínas de otras plantas. En ello se asemeja a las proteínas de la leche y es sorprendente como se complementa con otras proteínas como las de la soja (Estrada, 2000).

Tabla 3. Comparación del rendimiento y producción nutritiva por hectárea (Ha) de los principales cultivos. Tomado de la base de datos estadísticos de la FAO (FAOSTAT, 2013)

Cultivo	Rendimiento kg/ha	kg de proteína/ha	kg de proteína /ha/día	kg de carbohidrato/ha	Kcal/Ha/día
maíz	5,109	415	1.137	3,928	50,603
trigo	3,086	423	1.159	2,240	29,671
arroz	4,309	307	0.841	3,445	40,603
papa	17,268	345	0.945	3,017	36,110
yuca	12,460	169	0.463	4,742	53,151
soya	2,384	870	2.384	719	28,192
cebada	2,777	347	0.951	2,041	26,904
camote	13,467	211	0.578	2,710	31,233

La papa es el cuarto cultivo alimenticio más importante del mundo después del maíz, el arroz y el trigo. En el 2010 la producción mundial de papa fue de 324,420,782 toneladas (FAO, 2013). Entre los principales productores mundiales de papa se encuentra en primer lugar china, con una producción promedio de 68,206,679 toneladas en los últimos 10 años; en segundo lugar Rusia, con 33,475,791 toneladas en promedio; la India ocupa el tercer lugar con una producción media de 28,634,018 toneladas por año; el cuarto lugar es ocupado por los Estados Unidos cuya producción promedio por año fue 20,142,327 toneladas y finalmente ocupando el quinto lugar encontramos a Ucrania con una producción media de 18,996,082 toneladas en los últimos 10 años (FAO, 2013).

A nivel de Sudamérica el Perú produce el 26,6% del total del cultivo, por lo que según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), lo

ubica como el mayor productor de esta parte del globo, superando a Brasil (25,1%), Colombia (14,8%) y Argentina (14,0%). Aunque, en el ámbito mundial la producción peruana representa solo el 1,2%, bastante alejada de los grandes productores mencionados antes (FAO, 2013). En el Perú la papa es el cultivo alimenticio más importante, tanto en producción como en superficie sembrada y representa el 25% del PBI agropecuario. Es la base de la alimentación de la zona andina. La producción peruana de papa y su consumo ha aumentado a un ritmo estable en los últimos siete años. Entre el 2004 y 2011, la producción del tubérculo pasó de 3,01 millones de toneladas a 4,01 millones de toneladas, lo que significó un crecimiento 3,3% en el promedio anual, mientras que el consumo per cápita creció de 67 Kg. a 83 Kg. (8,9% de incremento). La papa se cultiva en 19 de los 24 departamentos del Perú, desde el nivel del mar hasta los 4200 metros de altura, ubicándose principalmente entre los 2,300 y 4,100 msnm. La producción de papa se obtiene mayormente del interior del país, concentrando el 98% de la producción nacional: Puno, Junín, Cusco, Huánuco, La Libertad, Cajamarca, Ayacucho, Apurímac, Huancavelica, Pasco, Ancash, Arequipa, Amazonas, Ica, Tacna, Piura, Moquegua y Lambayeque; mientras que Lima sólo representa el 2% (Agencia Agraria de Noticias, 2013).

II.1.2. Origen y domesticación de la papa cultivada

Las primeras papas cultivadas fueron seleccionadas entre 7,000 y 10,000 años atrás por pobladores de los Andes, según los datos obtenidos con radiocarbono de restos fósiles de papas encontradas en el Cañón de Chilca de la sierra peruana (Engel, 1970). A partir de dicha selección se generaron una gran cantidad de variedades cultivadas. Este proceso, cuando no se dio espontáneamente en la naturaleza, habría sido llevado a cabo deliberada o inconscientemente por el poblador altiplánico (Rodríguez, 2010).

Teniendo en cuenta los rasgos morfológicos y fitogeográficos históricamente se ha planteado que la primera papa cultivada fue *S. stenotomun*, a partir de la cual derivaron las demás especies o variedades de papa cultivada. Las especies silvestres progenitoras de las primeras papas cultivadas, o variedades nativas andinas, han estado por mucho tiempo en disputa, pero todas las hipótesis se centran en un grupo de 20 especies silvestres (que incluye diploides, tetraploides y hexaploides) morfológicamente similares a la papa cultivada conocidas como el complejo *S. brevicaule* distribuidas desde la sierra central del Perú hasta la sierra norte de Argentina (Correll, 1962; Ugent, 1970; Grun, 1990; Van der Berg y Jacobs, 2007).

Miller y Spooner (1999) estudiaron el complejo *S. brevicaule* usando RFLPs y RAPDs y pudieron separar débilmente a los miembros de este complejo en tres grupos: (i) las poblaciones peruanas del complejo *S. brevicaule* (norte), (ii) las poblaciones boliviano – argentinas del complejo *S. brevicaule* (sur), y (iii) *S. oplocense* (Bolivia y Argentina). Sin embargo estos autores sugieren que la mayoría de los taxa identificados en el complejo *S. brevicaule* son artificiales y más bien deberían tratarse como una sola especie altamente polimórfica *S. brevicaule*.

Al analizar el perfil genético de las papas cultivadas y especies silvestres relacionadas mediante AFLP nucleares, Spooner *et al.* (2005a) llegaron a la conclusión de que la papa nativa cultivada tiene un origen único o monofilético en una región extensa al norte del lago Titicaca (Altiplano sur peruano), a partir de los miembros peruanos del complejo *S. brevicaule*. Ante la clasificación taxonómica fútil del complejo *S. brevicaule*, en dicho estudio se dio prioridad a *S. bukasovi* como progenitor de la papa cultivada por ser la taxa con el nombre válido más antiguo de este grupo.

En un estudio fino en base a marcadores de alta resolución de DNA cloroplástico (ctDNA) para determinar las especies silvestres ancestrales de *S. stenotomun*, la papa cultivada más primitiva (Sukhotu *et al.*, 2006), se determinó que existían 4 clases de

ctDNA (s, a, c y w) en *S. stenotomun* de un total de 5 encontradas en las especies del complejo *S. brevicaule*. Los haplotipos a y c frecuentes de *S. stenotomun* fueron también encontrados en *S. bukasovii* (centro del Perú) y *S. canasense*, *S. candolleanum* y *S. multidissectum* (sur del Perú), respectivamente; por lo cual dichas especies silvestres serían los ancestros más recientes de *S. stenotomun*. Como conclusión de este estudio se señaló que el ctDNA de *S. stenotomun* pudo tener dos tipos de orígenes ya sea por una domesticación sucesiva (origen múltiple) a partir de diferentes especies ancestrales, o si una vez domesticada *S. stenotomun* presentó hibridación natural con otras especies silvestres (hipótesis de la introgresión), siendo *S. ajanhuiri*, resultado de la hibridización entre *S. stenotomun* y *S. megistacrolobum*, un ejemplo típico de esta última hipótesis.

Como se ha mencionado la domesticación de las primeras papa sucedió en el altiplano entre Perú y Bolivia, alrededor del lago Titicaca, dado que allí se encuentra la mayor variabilidad genética de especies silvestres y variedades andinas cultivadas (Estrada, 2000). Un segundo grupo de especies nativas crece en las tierras costeras al sur de Chile. Según Hawkes (1990) y Hosaka (2003) estos cultivares chilenos se derivaron secundariamente de los cultivares andinos que experimentaron hibridación natural con especies silvestres de *S. tarijense*, encontradas al sur de Bolivia y norte de Argentina.

Hosaka *et al.*, (1988) sugieren que las poblaciones nativas tetraploides chilenas se diferenciaron de las demás poblaciones tetraploides nativas de los Andes y de otras especies cultivadas y silvestres por la delección de 400 pares de bases de su DNA cloroplástico (ctDNA), denominado haplotipo t, el cual también se encuentra en algunas poblaciones diploides de la especie silvestre *S. tarijense*. Más del 99% de las papas que actualmente se cultivan en las zonas templadas del mundo presentan ctDNA tipo t, el cual es frecuente en la mayor parte del germoplasma chileno (Spooner y Hetterscheid, 2005).

El primer registro de las papas encontradas fuera de Sudamérica fue en las Islas Canarias, España, en 1562 (Hawkes y Francisco-Ortega, 1992; Spooner y Hetterscheid, 2005), y en Sevilla en 1573 (Hawkes y Francisco-Ortega, 1992). Todo indica que estas papas fueron cosechadas al final del año (noviembre y diciembre), lo cual sugiere que estos materiales pertenecieron a *Solanum t. andigena*, que se encuentra adaptada a días cortos. Parte de las introducciones de *Solanum t. andigena* y clones triploides pertenecientes a *S. chaucha*, aún persisten en las Islas Canarias, con las más recientes introducciones de *Solanum t. tuberosum* (Ríos *et al.*, 2007). A partir de ese momento la papa empezó a cultivarse rápidamente por toda Europa y luego en el mundo. El cultivo y la selección de esta papa la transformaron paulatinamente en un grupo de cultivares modernos con colores y formas más uniformes que sus ancestros andinos, y además con cualidades agronómicas superiores como lo son una mayor producción y resistencia a las enfermedades (Spooner y Hetterscheid, 2005).

Existen dos hipótesis sobre la procedencia de las primeras introducciones de papa cultivada a Europa. Juzepczuk y Bukasov (1929) proponen una introducción desde Chile (grupo de Chilotanum), en base a semejanzas morfológicas, y por su adaptación a días largos, por otro lado Salaman y Hawkes (1949), Hosaka y Hanneman (1988) y Grun (1990) sugieren una introducción desde los Andes peruanos.

La hipótesis de la introducción andina sostiene que inicialmente hubo i) una rápida selección convergente de la papa europea, por su morfología y adaptación a días largos, observables en los miembros del grupo de Chilotanum, y ii) un desplazamiento de la mayoría de los cultivares europeos por parte del germoplasma chileno o por híbridos formados a partir de este grupo (Spooner *et al.*, 2005b), como consecuencia de las epidemias mundiales de tizón tardío, que empezaron en el Reino Unido en 1845 y se dispersaron más adelante por todo el mundo. Es decir, que luego de dichas

epidemias hubo una posterior eliminación de clones del grupo Andigena, seguida de la difusión de clones del grupo Chilotanum (Ghislain *et al.*, 2009).

Una modificación de la hipótesis de la introducción andina sugiere que tanto los rasgos morfológicos como la adaptación a días largos que caracterizan a la papa europea, se desarrollaron rápidamente, de forma paralela entre los cultivares nativos andinos y chilenos, a través de diferentes tipos de selección realizada después de su llegada a Europa, como consecuencia de las epidemias de tizón tardío que destruyeron la papa en el Reino Unido a inicios de 1845, y que desplazaron a los cultivares que existían en Europa en ese momento. Las variantes así seleccionadas habrían sido posteriormente mejoradas con importaciones de cultivares nativos chilenos (Spooner *et al.*, 2005b). Esto constituye un argumento en contra de la hipótesis de que el tizón tardío (*Phytophthora infestans*) desplazó tempranamente a las variedades del grupo Andigena que habían sido introducidas.

Por último, Ghislain *et al.*, (2009) sugieren que clones de papa tanto del grupo Andigena como Chilotanum fueron inicialmente introducidos a Europa por múltiples vías. Sin embargo, los clones del grupo Chilotanum habrían sido preferidos en los procesos de selección, determinándose así su rápida expansión. Esto los llevaría a ser los cultivares modernos predominantes en Europa, para difundirse posteriormente en la mayoría de las zonas paperas más importantes del mundo.

II.1.3. Aspectos evolutivos de las papas cultivadas

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

pentaploides. Por tanto, las especies diploides serían las más primitivas y las pentaploides las más recientes (Vásquez, 1988).

La mayor parte de las especies silvestres presentan estolones largos, al final de los cuales se encuentran a los tubérculos. El tamaño de estos tubérculos varía desde unos cuantos milímetros (*S. clarum*, *S. morelliforme*) hasta varios centímetros, comparable con las especies cultivadas (*S. burtonii*, *S. candolleanum*). De igual modo su morfología varía desde tubérculos globosos hasta tubulares, ya sean rectos o curvos, y con varias formas intermedias (Hijmans et al, 2002).

Una de las tendencias morfológicas selectivas en la domesticación de la papa fue la reducción de la longitud de los estolones, lo que favoreció la concentración de los tubérculos al pie del tallo y por lo tanto una menor demanda de tiempo y energía para su recolección (Hijmans *et al.*, 2002; Spooner *et al.*, 2005a). Asimismo, en su domesticación pudo estar implicada la selección de tubérculos menos tóxicos y con menores niveles de glicoalcaloides. En cuanto a la forma y color de los tubérculos los agricultores andinos mantuvieron una mayor variedad en las especies cultivadas con respecto a los observados en las especies silvestres (Simmonds, 1995). Finalmente, se seleccionaron poblaciones con madurez temprana (precocidad), periodo de dormancia adecuado y resistencia a diferentes tipos de estrés abiótico (Bradshaw, 2007), buscando siempre tubérculos de mejor sabor, mayor tamaño y producción. Estas características mencionadas son comunes en todas las especies de papa cultivada, a pesar del gran polimorfismo que existe entre ellas (Matsubayashi, 1991).

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

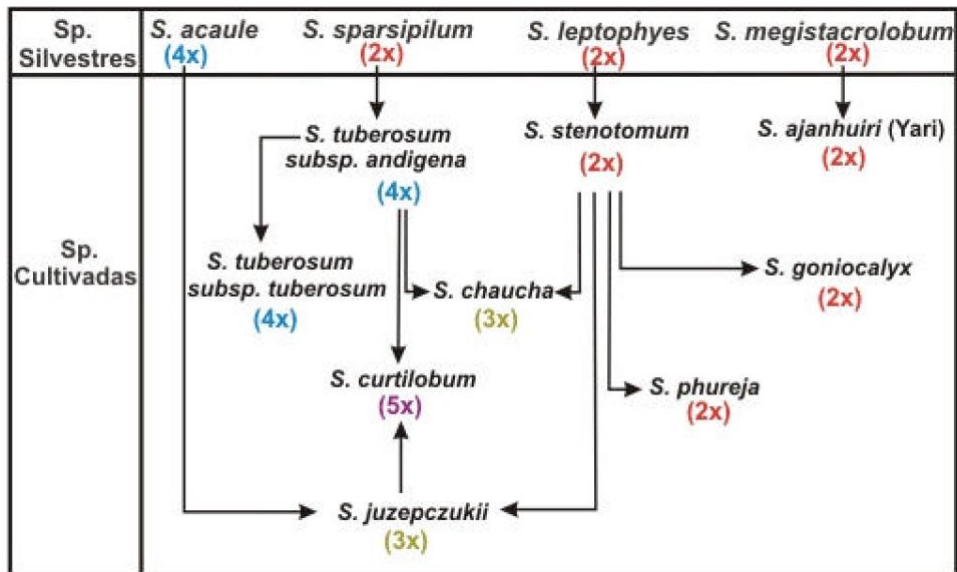


Figura 1. Relaciones evolutivas de las papas cultivadas con sus ancestros silvestres y sus niveles de ploidía (Adaptado de Hawkes, 1990).

Una hibridización natural de *S. stenotomun* con la especie silvestre *S. sparsipilum*, seguida de una duplicación cromosómica habría producido la especie tetraploide *S. tuberosum* subsp. *andigena* en los Andes centrales (Cribb y Hawkes, 1986). Sin embargo algunos investigadores consideran que las papas tetraploides andinas se habrían originado solo de *S. stenotomun* por simple duplicación cromosómica. Esta subespecie tetraploide fue llevada al sur de Chile por los antiguos habitantes andinos, donde empezó a adaptarse a días largos, allí fue donde evolucionó hacia la subsp. *tuberosum*. Probablemente en el trayecto desde los andes centrales hacia las tierras bajas chilenas fue donde se dio origen a *S. tuberosum* subsp. *tuberosum* por medio de la hibridación de *S. tuberosum* subsp. *andigena* (como progenitor masculino) con una especie silvestre boliviana o argentina de *S. tarijense*, poseedora de factores para la esterilidad citoplásmica (Hawkes, 1990; Hosaka, 2003).

En cuanto a *S. goniocalix* surgió como una variante de *S. stenotomun*, presentando una alta diversidad desde el norte del Perú hasta el centro de Bolivia. Otra especie derivada de *S. stenotomun* por un proceso de selección artificial es *S. phureja* que se caracteriza por haber perdido su periodo de dormancia al momento de la cosecha, rápido desarrollo de los tubérculos y mejor desarrollo del cultivo. Esto le permitió a los

agricultores obtener hasta tres cultivos por año en las zonas bajas y cálidas de los valles orientales de los Andes. Actualmente, *S. phureja* se distribuye ampliamente en una larga y estrecha franja de los Andes, desde Venezuela hasta el centro de Bolivia, mientras *S. stenotomum* está restringida solo a Perú y Bolivia (Figura 2). (Hawkes, 1990; Sukhotu y Hosaka, 2006; Guishlain et al, 2006; Bradshaw, 2007). Por otro lado, la hibridización natural de *S. stenotomum* con la especie diploide resistente a las heladas *S. megistracrolobum* produjo la especie *S. ajanhuiri*, una papa amarga cultivada en una estrecha región alrededor del lago Titicaca (Huamán *et al.*, 1982).

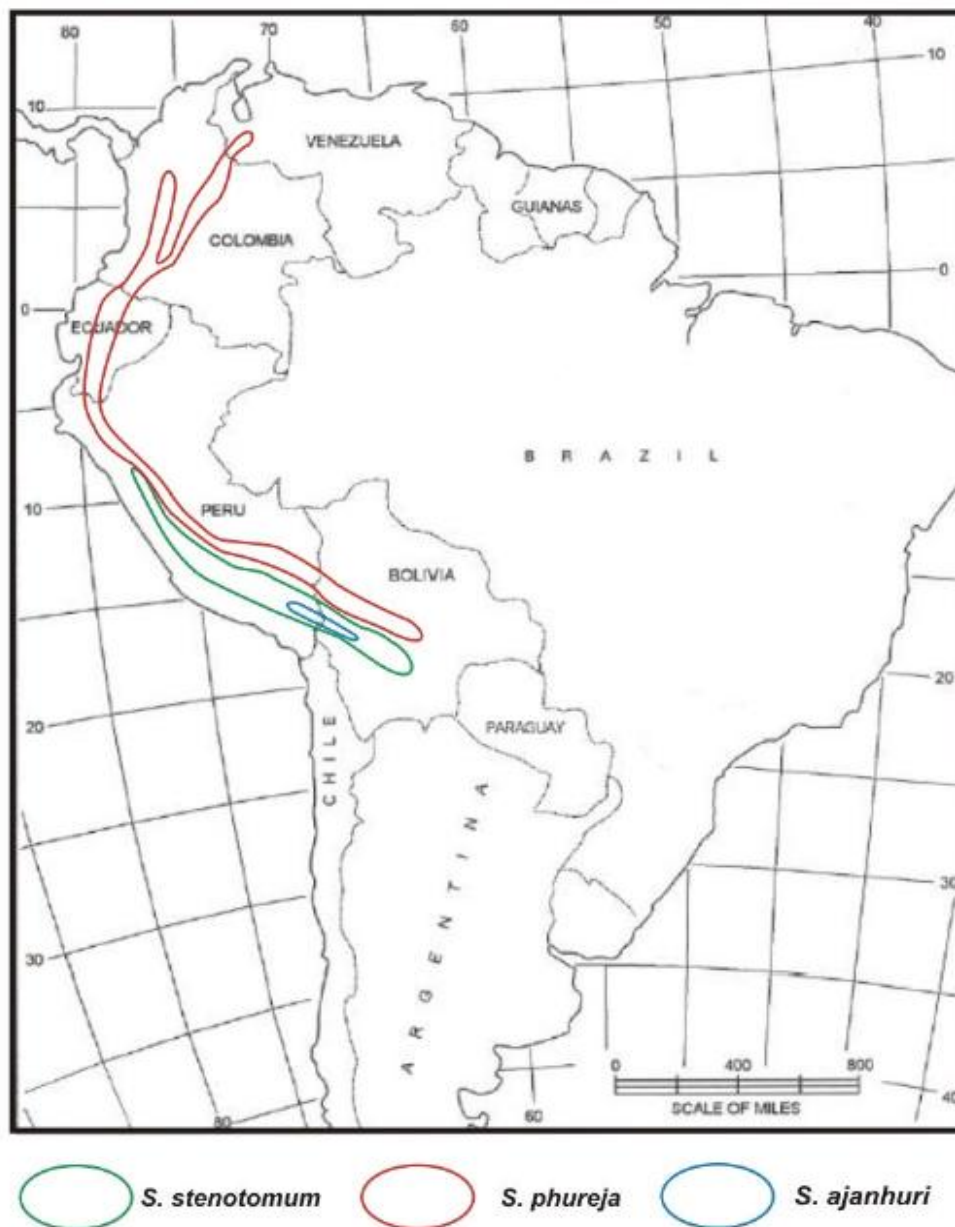


Figura 2. Distribución de las especies diploides de papa cultivada (Hawkes, 1990).

La hibridización entre *S. stenotomun* y la especie tetraploide silvestre *S. acaule* produjo el híbrido triploide estéril *S. juzepczukii*, que incorporó la alta resistencia a las heladas de *S. acaule*. Una posterior hibridización entre *S. juzepczukii* y *S. t. subsp. andigena* produjeron al híbrido poco resistente al frío denominado *S. curtilobum*. Para que se diera este híbrido tuvo que involucrar a un gameto no reducido ($2n$) de *S. juzepczukii* y un gameto normal (n) de *S. tuberosum* subsp. *andigena* (Hawkes, 1962)

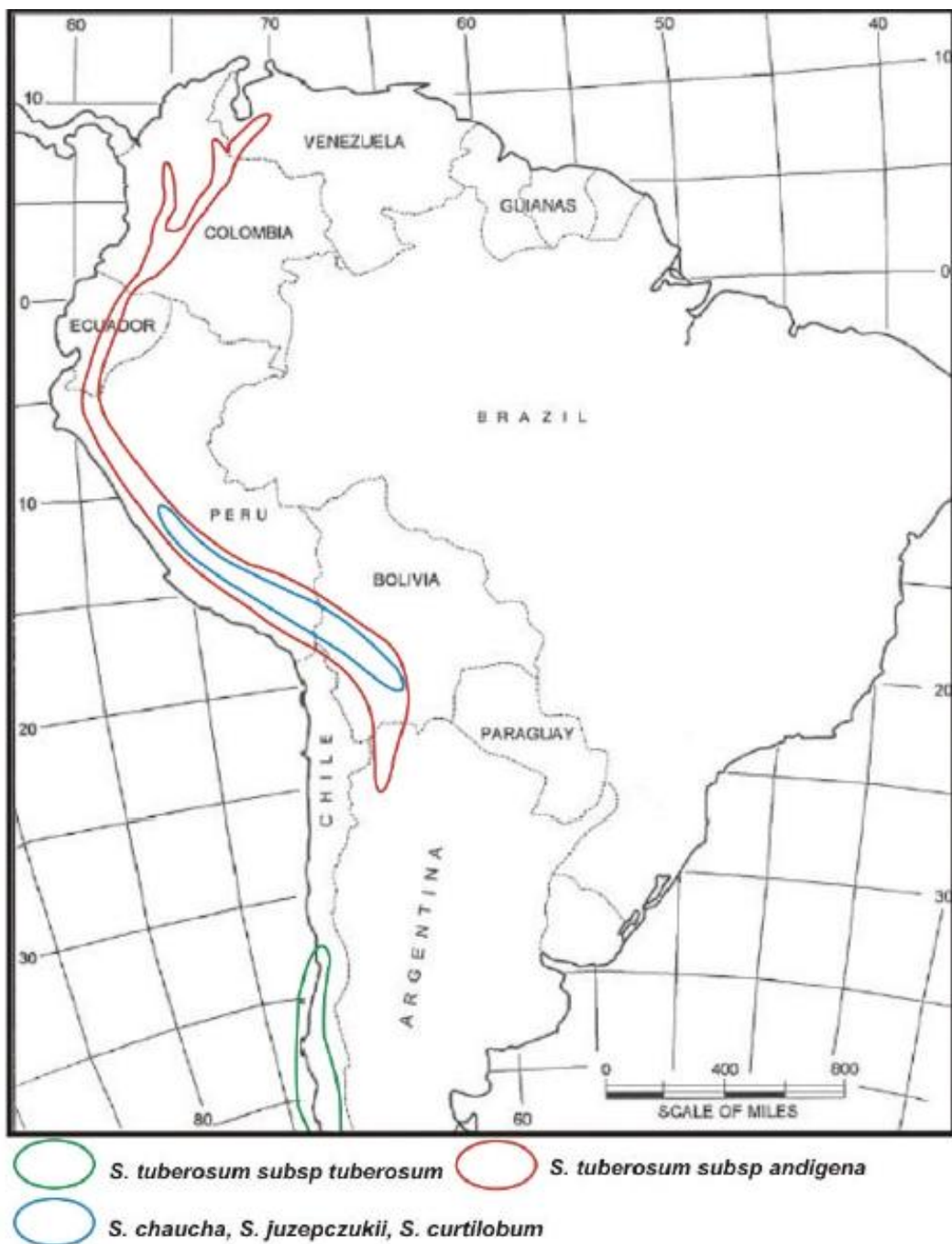


Figura 3. Distribución de las especies poliploides de papa cultivada (Hawkes, 1990).

Una serie de cruces naturales entre *S. stenotomun* y *S. tuberosum* subsp. *andigena* dieron lugar al híbrido triploide denominado *S. chaucha* (Jackson *et al.*, 1978). La distribución de estos híbridos, como se aprecia en la figura 3, comprende una vasta región de los andes centrales entre Perú y Bolivia.

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

II.1.4. Clasificación taxonómica de la papa cultivada

Las especies de papas cultivadas y silvestres están clasificadas dentro de la siguiente posición taxonómica (Engler, 1887–1915):

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

(Adaptado de Ochoa, 1999)

II.2.1. Diversidad y variabilidad genética

La diversidad genética se define como la cantidad de variación genética medible que está contenida dentro de una población o especie (Freeland, 2005).

La variabilidad genética es la variación del material genético dentro de una población determinada y es un componente de la diversidad genética. La variación entre poblaciones de una especie, más la variación dentro de las poblaciones es la diversidad genética total. Mientras las especies pueden ser más o menos diversas, las características genéticas (caracteres) dentro de las poblaciones pueden ser más o menos variables. Para que la selección natural pueda actuar sobre un carácter, este debe ser lo suficientemente variable de tal modo que se elija al más adecuado y permita la supervivencia de la especie. Es así, como la variabilidad genética constituye la base del progreso genético (Rochambeau *et al.*, 2000).

No hay que confundir la diversidad genética con la variabilidad genética, que es característica de las poblaciones dentro de una especie (Sevilla y Holle, 2004).

El mantenimiento de una amplia variabilidad y diversidad genética tiene un elevado impacto sobre el rendimiento y la estabilidad del comportamiento de la papa. Mendoza y Haynes (1974) proponen una teoría donde la habilidad para el rendimiento está asociada con la heterocigocidad. Por lo tanto, el mantenimiento de una amplia variabilidad genética permitirá una heterocigocidad máxima lo que a su vez asegura un máximo rendimiento y estabilidad del comportamiento bajo condiciones donde no hay control de plagas y enfermedades. Además, la amplia variabilidad genética ofrece la oportunidad de incorporar genes que no se encontraban en el germoplasma cultivado o que estaban en frecuencias bajas.

Los agricultores de los Andes mantienen mezclas de diversas variedades en cultivo como una sabia estrategia de defensa contra los patógenos y/o insectos que no podrán atacar con igual intensidad los diversos genotipos (Estrada, 2000). Por tanto, el

entendimiento de la diversidad genética de una especie cultivada nos permitirá manejarla, protegerla y utilizarla de manera óptima.

II.2.2. Polimorfismo genético

Es un parámetro de la variabilidad genética poblacional que se define como la existencia de dos o más alelos asociados a un locus en una población con una frecuencia relativa sustancial (generalmente mayor al 1%). La generación de polimorfismo genético en un locus se debe principalmente a mutaciones puntuales, inserciones, deleciones, conversión génica y recombinación intralélica, los cuales se han estabilizado en una población y región geográfica determinada (Nei y Kumar, 2000).

II.2.3. Cuantificación de la diversidad genética

Existen estimadores de la diversidad genética basados principalmente en frecuencias alélicas o frecuencias genotípicas. Los principales estimadores de la diversidad genética son: la riqueza alélica, la diversidad alélica, porcentaje de loci polimórficos, heterocigosidad esperada (H_e) y heterocigosidad observada (H_o) y el índice de contenido de polimórfico (PIC) (Aranguren-Méndez *et al.*, 2005). Entonces tenemos:

- **Riqueza alélica:** Es el número total de alelos distintos, que pueden pertenecer a diferentes locus, de una muestra poblacional. Este estimador está influenciado por la cantidad de individuos en la muestra ya que por lo general a mayor cantidad de individuos mayor riqueza alélica.
- **Diversidad alélica:** La frecuencia relativa de un alelo en particular en una población es denominada frecuencia alélica. La frecuencia alélica es considerada un indicador fundamental en estudios evolutivos, porque un cambio genético en una población es usualmente descrito por un cambio en la frecuencias de sus alelos (Nei y Kumar, 2000). La frecuencia alélica en especies diploides consiste en número de alelos de un tipo dado dividido entre

dos veces el tamaño poblacional para un locus autosomal y la diversidad alélica constituye simplemente el número promedio de alelos por locus. Sin embargo, dicha medida depende mucho del número de individuos analizados, ya que cuando el número es grande, mayor es la probabilidad de detectar alelos suplementarios.

- **Porcentaje de loci polimórficos:** Un locus se considera polimórfico si podemos detectar más de un alelo en una población. Generalmente el criterio más utilizado es del 1%, es decir, un locus será polimórfico si el alelo más común presenta una frecuencia menor al 99% en la población bajo estudio (Aranguren-Méndez *et al.*, 2005).
- **Heterocigosidad:** La heterocigosidad (H) constituye la proporción de individuos heterocigotos en la población. Un valor de heterocigosidad elevado significa que existe una elevada diversidad alélica presente en la muestra analizada (Butler, 2005). La heterocigosidad puede ser dividida en dos indicadores: la heterocigosidad esperada (H_e) y la heterocigosidad observada (H_o). La heterocigosidad esperada (H_e) también llamada diversidad génica (h) de Nei (1973), es definida como la probabilidad que dos alelos escogidos al azar en una población sean diferentes (Weir, 1996). La H_e es usada comúnmente como una medida de diversidad genética que refleja el nivel de heterocigosidad que podría esperarse en una población que se encuentre en equilibrio de Hardy-Weinberg. La heterocigosidad observada (H_o) es definida como la proporción de individuos heterocigotos observados del total para un locus en particular (Weir, 1996).
- **Índice de Contenido Polimórfico (PIC):** El PIC al igual que la heterocigosidad oscila entre 0 y 1. Este índice evalúa la informatividad de un marcador en la población de acuerdo a las frecuencias de los alelos y probabilidad de cruce. Clásicamente se le define como:

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^n p_i^2 - \left(\sum_{i=1}^n p_i^2 \right)^2 - \sum_{i=1}^n p_i^4$$

Donde:

p_i es la frecuencia del i -ésimo alelo y “n” es el total de los alelos encontrados (Botsein *et al.*, 1980).

II.2.4. Estructuración y diferenciación genética poblacional

La estructura poblacional constituye la cantidad de variabilidad genética y su distribución dentro y entre subpoblaciones locales e individuos dentro de una misma especie. Existen diferentes métodos para estimar la estructura y diferenciación genética en poblaciones, los más utilizados son la medición de la estadística F, la distancia genética y el análisis de estructura.

Análisis de la estructura poblacional - estadística F

La estadística F o estadística de Wright mide la correlación entre genes a diferentes niveles jerárquicos en una población subdividida (Freeland, 2005).

El índice de fijación F_{st} es la medida más usada para describir la diferenciación genética en poblaciones; mide cuan diferentes genéticamente son dos poblaciones y refleja la proporción de la variabilidad genética total que se debe a las diferencias netas entre las poblaciones (Felsenstein, 2013). Los valores de F_{st} pueden variar entre 0 y 1. Si dos poblaciones presentan frecuencias alélicas iguales, el valor de F_{st} es igual a 0. En contraste, si dos poblaciones presentan frecuencias alélicas totalmente diferentes, el valor de F_{st} es igual a 1.

Análisis de la diferencia y distancia genética

Generalmente, para estudiar las diferencias entre poblaciones se comparan las frecuencias alélicas observadas de cada locus mediante una prueba adecuada y se calculan las distancias genéticas entre ellas. En este sentido, la distancia genética mide el grado de diferenciación existente entre poblaciones de una misma especie, o

entre especies, pudiéndose cuantificar esa diferencia mediante índices de distancias. Las distancias genéticas ayudan a entender las relaciones evolutivas entre poblaciones y nos permite obtener información para la caracterización de razas (Nagamine y Higuchi, 2001). De las distancias genéticas es importante estudiar el tipo de distancia, el método de construcción del dendrograma o algoritmos y el análisis de remuestreos.

Las matrices de las distancias genéticas entre poblaciones pueden ser convertidas en árboles evolutivos o dendrogramas utilizando métodos de agrupamiento, tales como, el método de agrupamiento no ponderado por pares utilizando la media aritmética (UPGMA) o el *Neighbour Joining* (NJ) (Goldstein y Schlotterer, 1999). Es así como los dendrogramas no son más que la representación gráfica de una matriz de distancias, y que bajo ciertas condiciones, esta representación puede ser tomada como una estimación de la filogenia.

El análisis de la significancia estadística de una medida de distancia genética se basa en el método de *bootstrapping* (o *bootstrap*). El *bootstrapping* es un método que consiste en la generación de grupos de datos nuevos mediante un remuestreo. Se utiliza frecuentemente para aproximar el sesgo o la varianza de un estadístico, construir intervalos de confianza, realizar contrastes de hipótesis y determinar el error estándar para las medidas de distancia genética (Nei y Kumar, 2000).

II.2.5. Factores que influyen en la diversidad y estructura genética

La diversidad y estructura genética están influenciadas por varios factores (Figura 4), siendo los principales la deriva génica, flujo genético, la reducción poblacional, la selección natural y artificial, y los métodos de reproducción (Freeland, 2005).

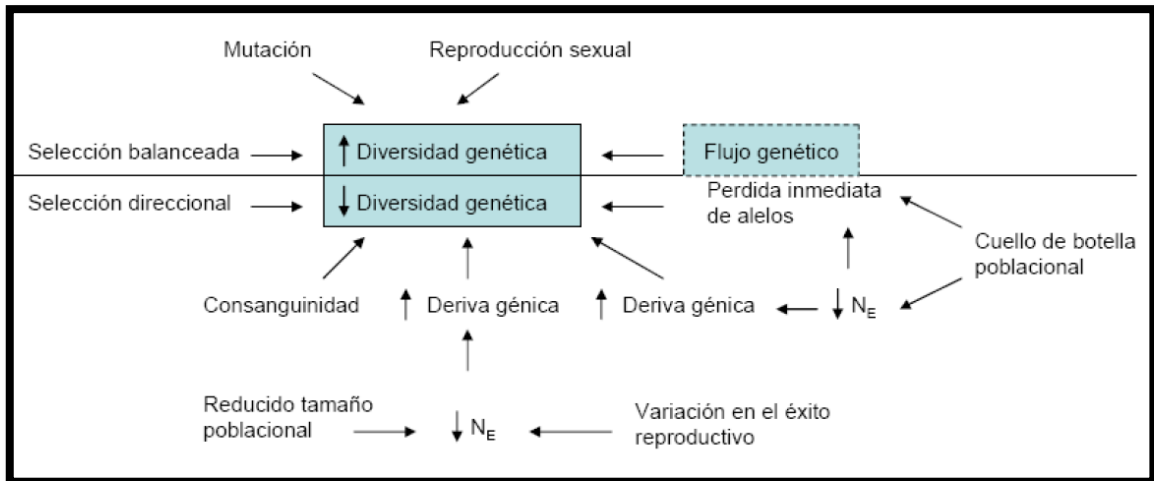


Figura 4. Principales factores que influyen en los niveles de diversidad genética dentro de una población. N_e es el número de la población efectiva (Adaptado de Freeland, 2005).

II.3. *Pool* genético

El término *Pool* genético o acervo genético se ha creado para relacionar las diferentes categorías de germoplasmas y su posibilidad para el intercambio de genes. El *pool* de genes primario, que está compuesto de todas las poblaciones de una misma especie: cultivares nativos, obsoletos, mejorados y poblaciones en proceso de mejoramiento. Las poblaciones dentro del *pool* de genes primario se cruzan libremente y pueden intercambiar genes sin limitación. En algunas especies, las poblaciones silvestres relacionadas pertenecen también a este *pool* ya que se cruzan libremente con las poblaciones cultivadas (Sevilla y Holle, 2004).

II.4. Mejoramiento genético de la papa

II.4.1. Recursos fitogenéticos como fuente de mejoramiento

Los recursos fitogenéticos o recursos genéticos vegetales son el conjunto de genes de gran valor e importancia, y que son útiles o potencialmente útiles para ser utilizados en el fitomejoramiento y en biotecnología. Tales recursos básicamente se encuentran conformados por especies cultivadas y silvestres. Sin ellos no se podrían dar nuevas variedades o cultivares que son requeridos constantemente por la agricultura moderna para enfrentar los cambios medioambientales, satisfacer nuevas demandas de los

consumidores y abastecer alimentos en calidad y cantidad suficientes para atender las crecientes necesidades de la población. Por lo tanto, la diversidad genética de un cultivo, proveniente de sus recursos filogenéticos, se traduce como adaptación a diversos ambientes, la capacidad para tolerar sequías, crecer en suelos pobres, resistir a las y enfermedades, dar mayor productividad, mejor calidad nutritiva o producir alimentos de mejor sabor, característica que son transmitidas naturalmente por los genes que portan los individuos que conforman una especie (Andrade, 2001).

Los parientes silvestres de los cultivos frecuentemente proveen fuentes útiles de genes. Es así que la especie silvestre de arroz *Oriza nivara* fue utilizada para introducir resistencia al virus de atrofia herbácea *grassy stunt* (Khush, 1972). En África y la India, variedades locales de yuca (*Manihot esculenta*) incrementaron su producción hasta 18 veces después que fueran introducidos genes de resistencia a plagas de yuca silvestre brasileña. Asimismo, en Estados Unidos se usaron especies silvestres asiáticas de caña de azúcar para introducir genes de resistencia a plagas hacia las variedades norteamericanas, salvándolas del colapso (Prescott-Allen, 1982).

La papa posee los mayores recursos genéticos conocidos para un cultivo, unas 200 especies silvestres con gran diversidad de caracteres y con la ventaja de que ese rico germoplasma puede ser incorporado en cultivares mediante cruzamientos o manipulaciones genéticas. Por otra parte, el germoplasma cultivado o primitivo de los Andes se encuentra representado por ocho especies de papa cultivada (Huamán, 1986), las cuales poseen aproximadamente 5000 variedades que están conservadas y mantenidas en el Centro Internacional de la Papa (CIP). Estos cultivares andinos son más cercanos a los cultivares modernos y por ende se pueden cruzar con mayor facilidad. Es así que el potencial genético para mejorar el rendimiento del cultivo de la papa es muy grande y se considera que este podría duplicarse en relación a las cifras actuales (Estrada, 2000).

II.4.2. Variedades mejoradas andinas

Para obtener variedades mejoradas en la zona andina los primeros cruzamientos fueron básicamente entre *S. tuberosum* subsp. *andigena* x *S. tuberosum* subsp. *andigena*. Es así que en el Perú de la década del 50 el profesor Carlos Ochoa obtuvo la variedad Renacimiento que fue muy exitosa en esa época (Sevilla y Holle, 2004).

En la zona andina, Ochoa y De la Puente, en el Perú, desarrollaron varios cultivares, entre los cuales destacan Mariva y Tomasa Condemayta. Por otra parte, Estrada, Pérez y un grupo de investigadores obtuvieron en Colombia un número considerable de cultivares, de los cuales son notables Parda Pastusa, Monserrate, Purace, Capiro; Nariño y Huila. Posteriormente, varios cultivares en el CIP se han difundido en el Perú, como son Perricholi, María Huanca, andina, Canchan, Yungay, Liberteña, Amarilis y Kori, que tienen resistencia al tizón y a las heladas (Estrada, 2000) (tabla 4).

Tabla 4. Principales variedades mejoradas por el CIP y el Instituto de Investigación y Promoción Agropecuaria (INIPA). Tomado de Estrada (2000)

Progenitores	Variedad	Institución	Año de cruce
Jiruco (<i>adg</i>) x Shuito (<i>adg</i>)	Renacimiento	INIPA	1962
Jiruco (<i>adg</i>) x Casablanca (<i>adg</i>)	Mantaro	INIPA	1962
Shiri (<i>cur</i>) x Casablanca (<i>adg</i>)	Renovación	INIPA	1963
[Saskia (<i>adg</i>) x Earline (<i>tbr</i>)] x [Huagalina (<i>adg</i>) x Renacimiento (<i>adg</i>)]	Yungay	INIPA	1963
[B-606 (<i>tbr</i>) x Katahdin (<i>tbr</i>)] x [Renacimiento (<i>adg</i>) x Yana (<i>adg</i>)]	Tomasa Condemayta	INIPA	1965
[Saskia (<i>adg</i>) x Huagalina (<i>adg</i>)] x [Renacimiento(<i>adg</i>) x Libertad (<i>tbr</i>)]	Antarqui	INIPA	1966
Maritta (<i>tbr</i>) x Vaccapa callum (<i>tbr</i>)	Mariva	INIPA	1969
Naranja (<i>adg</i>) x [Katadih (<i>tbr</i>) x Mantaro (<i>adg</i>)]	Revolución	INIPA	1970
India 1058 (<i>tbr</i>) x 700764 (<i>adg</i>)	Perricholi	CIP	1974
M 1266 14 (<i>tbr</i>) x 760015 (<i>cur</i>) x 701221 (<i>adg</i>)	Tahuaqueña	CIP	1974
AM66 426 (<i>tbr</i>) x 276012.24 (<i>adg</i>)	Kori	CIP	1977
BL 1 2 (<i>tbr</i>) x Murillo III (<i>stn</i> x <i>stn</i>)	María Huanca	CIP	1979
[Monserrate (<i>tbr</i> x <i>adg</i>)x Atzimba (<i>tbr</i>)] x <i>tbr</i> masal	Canchán	CIP	1980
	Amarilis	CIP	1984

II.4.3. Variedades de papas nativas del Perú

Como se ha mencionado en el Perú existen alrededor de 3000 variedades de papas nativas, estas se concentran básicamente en los Andes del centro y sur peruano. Según el catálogo de variedades de papas nativas del Perú, realizado por el año internacional de la papa (Gómez *et al.*, 2008) existen alrededor de 50 variedades de papas nativas prometedoras desde el punto de vista comercial. Ya que presentan sabor atractivo, rendimiento aceptable y posibilidades de cosecha en diferentes épocas del año. Estas papas han sido agrupadas de la siguiente manera: comerciales, semicomerciales, con potencial de mercado y amargas (tabla 5).

Las papas nativas comerciales se distribuyen regularmente en los principales mercados nacionales de diferentes tipos, ya sea como insumo de productos procesados, puré, chips, papa pelada precocida o enteras, por sus buenas cualidades culinarias.

Las papas nativas amargas son denominadas así porque sus tubérculos contienen altos niveles de alcaloides, lo que les confiere ese amargor, pero a la vez esto constituye una defensa natural contra el ataque de plagas y una buena capacidad de adaptación a las heladas. Estas papas no se consumen directamente sino más bien son detoxificadas y procesadas para obtener chuño.

Las papas nativas semicomerciales básicamente se venden en los mercados locales y ferias, pero tienen el potencial para llegar a mercados más amplios. Para asegurar su producción éstas son sembradas con otras variedades con el objetivo de reducir el daño por plagas. Las papas nativas con potencial de mercado son aquellas con formas, colores y sabores particulares que pueden tener un interesante potencial comercial. Actualmente no se comercializan sino que más bien se intercambian en ferias locales (Gómez *et al.*, 2008).

Tabla 5. Variedades de papas nativas de interés comercial en el Perú (Gómez *et al.*, 2008)

Variedad de papa nativa	Nombres alternativos	Región de procedencia
Comerciales		
Amarilla Tumbay	Tumbay, Papa Amarilla, Tumbuy	Cerro de Pasco, Huanuco, Junin
Huagalina	Amarilla del Norte, Papa Amarilla	Cajamarca, La Libertad, Ancash
Huamantanga	Puka Suytu, Juitu Rojo	Huancavelica, Ayacucho, Junin
Muru Wayro	Huayro, Huayro Moro, Muru Wayrush	Junin, Huanuco, Huancavelica
Peruanita	Jilguero, karwash Munilla, Milagro	Huanuco, Cerro de Pasco, Junin
Puka Wayro	Huayro rojo, Huayro, Wayrush	Junin, Huanuco, Huancavelica
Semicomerciales		
Camotillo	Camotilla, Garhuash, Karwash	Junin, Cerro de Pasco, Huanuco
Ishkupuru	Qarwash Shuito, Runtush Shuytu	Huanuco, Cerro de Pasco, Junin
Pepino Suytu	Yana Acero Suytu, Yana huamantanga	Huancavelica, Ayacucho, Junin
Puka Imilla	Wila Imilla, Puka Warmi, Imilla Roja	Cusco, Apurimac, Puno
Qompis	Puka Qompis, Papa Rosada	Cusco, Apurimac, Puno
Sani Imilla	Sani, Chola, Lola	Puno, Cusco, Apurimac
Tarmeña	Puka Murunki, Muru Warmi	Junin, Huanuco, Huancavelica
Yana Imilla	Imilla Negra, Salamanka	Puno, Cusco, Apurimac
Yana Paqocha Senqan	khuchi Aka, Yana Putis	Cusco, Apurimac, Ayacucho
Yana Piña	Yana canastilla, Piña Negra	Cusco, Apurimac, Junin
Yana Pumamaki	Pumamaki, Pumapa Makin	Ancash, Junin, Huanuco
Yuraq Imilla	Imilla Blanca, Yuraq Qompis	Puno, Cusco, Apurimac
Con Potencial de Mercado		
Amarilla Chunchup	Amarilla, Choines	Huanuco, Cerro de Pasco
Ambar	Pira	Ancash
China Runtush	Ninguno	Cerro de Pasco, Junin
Chiqui Bonita	Riñona	Cajamarca, La Libertad, Cusco
Huarina	Rukupá Punkan	Huanuco, Junin
Khuchi Chuqchan	Ninguno	Cusco
Khuchipa Ismaynin	Khuchiaka	Junin, Puno, Cusco
Kusi	Palta Kusi, Yana Kusi	Cusco
Leona	Bolona Negra	Cajamarca
Llama Ruru	China Llama ruru, Mauna	Cusco, Puno, Huancavelica
Muru Shoqo	Puka Imilla	Cerro de Pasco, Ancash
Natin Suytu	Ninguna	Huanuco
Paqocha	Muru Ureña	Cerro de Pasco, Huanuco
Pillpinto	Puka Allqu, Taragallu, Poluya	Ayacucho, Apurimac
Puka Duraznillo	Duraznillo, Puka quello, pukrus	Apurimac, Cusco, Ayacucho
Puka Mikush	Milagro	Cerro de Pasco, Huanuco
Qeqorani	Azul Sonqo, Qeqerana	Cusco, Ayacucho, Huancavelica
Rubi	Granada, Rubi Roja	Junin, Huancavelica, Puno
Rukuma	Yana Akshu, Yana Mushka, Rukmay	Junin, Huancavelica, Huanuco
Sandia	Puna Leona	Junin
Soqo Waqoto	Yana Chinchí, Yana Chinchero	Cusco
Sua Pusay	Ninguno	Ayacucho
Thuruna	Puka Thuruna	Puno, Cusco
Trompos	Trombos, Hakuwayaqa	Cusco, Junin
Wila Qoyllu	Puka Qoyllu, Qoyllu Imilla	Junin, Puno
Yana Shukre	Khuchipa Chupan, Yana Shuito	Junin, Huancavelica, Apurimac
Yana Warki	Warmanpa Uman	Ayacucho, Apurimac
Amargas		
Laram Oqoquri	Oqoquri morado, Azul Shiri, Yana Shiri	Cusco, Puno, Apurimac
Loqa	Hanqo Kaisalla, Parco Morado	Puno
Piñaza	Qheta Kaipe, Orqo Mallku, Piñaza Luki	Cusco, Puno, Apurimac
Yuraq Oqoquri	Hanqo Oqoquri, Waña, Yuraq Ruki	Cusco, Puno, Arequipa

II.4.4. Variedades de papa cultivada de mayor demanda en el Perú

Según el “Catalogo de Semilla Básica de Papa en el Perú”, realizado en 1994 dentro del marco del proyecto SEINPA (semilla e investigación en papa), existen ciertas variedades comerciales de papa con mayor demanda, tanto en la sierra como en la costa, las cuales han sido limpiadas de patógenos, para producir semilla básica (tubérculo obtenido de la semilla genética y sometido a un proceso de certificación). Entre éstas tenemos variedades nativas dulces, variedades nativas amargas y variedades mejoradas (tabla 6).

II.5. Caracterización del germoplasma

No podemos utilizar lo que no conocemos. Esto es lo que sucede frecuentemente con el germoplasma, sobre todo en los países que cuentan con una gran diversidad biológica (Sevilla y Holle, 2004). La caracterización del germoplasma se inicia con la colección de los especímenes representativos de una población o especie. Esta debe finalizar con la difusión de la información pertinente de las características del germoplasma para que posteriormente pueda ser utilizada por los usuarios. El objetivo principal de la caracterización es describir y dar a conocer el valor del germoplasma. Hay otros objetivos más específicos como la identificación taxonómica correcta; la descripción morfológica; la evaluación de caracteres de valor agronómico; las estimaciones de variabilidad fenotípica y genética; y las relaciones entre características. Para cumplir con dichos objetivos los investigadores se valen de descriptores morfológicos, técnicas bioquímicas y marcadores moleculares (caracterización del genoma).

Los descriptores morfológicos son aquellos que describen las características cuantitativas y cualitativas observables en el cultivo que se encuentra en cierto estadio; así pueden ser el color de la flor, la forma o tamaño de los tubérculos, la altura de la planta, el diámetro del tallo, entre otros (Sevilla y Holle, 2004).

Tabla 6. Producción en toneladas de semilla básica de papa por variedad y región, campaña 1992-1993. Tomado de Catalogo de Semilla Básica de Papa en el Perú (SEINPA, 1994)

Variedades	Norte	Centro	Sur	Total
Nativas dulces				
Ccompis, Yurac Sisa		3.4	55.2	58.6
Mactillo, Huaricocha, Huancucho			26.8	26.8
Yana Imilla, Imilla Negra			8.3	8.3
San Cristobal		5		5
Huayro		0.3	2.4	2.7
Puka Duraznillo		2		2
Amarilla del Centro, Runtus		1.8		1.8
Peruanita, Milagro, Ofrenda			0.1	0.1
Sani Imilla, Lola, Chola			0.1	0.1
Imilla Blanca, Yurac Imilla			0.1	0.1
Huagalina, Amarilla del Norte	0.1			0.1
Nativas Amargas				
Piñaza, Piñaza Luckii			2	2
Ruckii			0.6	0.6
Ocucuri Blanca, Yuraq Waña			0.2	0.2
Ocucuri Morada, Choquepito Morado, Ocucuro			0.2	0.2
Ajanhuiiri, Ajawiri			0.1	0.1
Loc'ka			0.1	0.1
Mejoradas				
Yungay	29.7	76.6	56.3	162.6
CICA			161.3	161.3
Tomasa Tito Condemayta		28.5	58.8	87.3
Revolución	1	36.9	35.4	73.3
Perricholi	38.8	29.5		68.3
Valicha			59.2	59.2
Mariva	9	17.7	1.8	28.5
Liberteña	8	17.7		25.7
Micaela Bastidas			22.1	22.1
Andina			16	16
Huancayo		9.4		9.4
Maria Huanca	8.2	1.1		9.3
Amapola	4.3			4.3
Molinera	0.5	2.1		2.6
Ticahuasi		0.8		0.8
Chasqa			0.4	0.4
Canchan INIA			0.1	0.1
Amarilis INIA			0.1	0.1
Kori INIA			0.1	0.1
Total de toneladas	99.7	232.8	507.7	840.2

Los marcadores bioquímicos consisten básicamente en enzimas, pudiendo ser isoenzimas o aloenzimas que son codificados por variantes de genes estructurales. Cada una de estas variantes puede ser detectada por su patrón de migración cuando son sometidas a una electroforesis en gel de poliacrilamida. Por lo tanto nos pueden dar una idea del polimorfismo del locus que codifica dicha enzima (Kephart, 1990). Estos marcadores a pesar de su naturaleza proteica molecular son en principio

marcadores fenotípicos, es decir que están influenciados por el entorno, es así, por ejemplo, que la expresión de una determinada enzima en la raíz, puede no ser la misma en la hoja ya que la expresión es regulada de acuerdo al tejido. Este tipo de marcadores, a pesar de su polimorfismo limitado, han sido utilizados para estudios de estructura poblacional y divergencia poblacional (Frevile et al, 2001), estudios de diversidad en cultivares y especies relacionadas (Hamrick y Godt, 1997), para identificar ancestros de híbridos (Parani *et al.*, 1997), entre otros. La caracterización del genoma se hace a nivel de los cromosomas. La caracterización puede ser morfológica, genética o a nivel molecular. Las dos primeras corresponden al campo de la citogenética, y son indispensables para la caracterización a nivel molecular.

II.6. Marcadores moleculares

Los marcadores moleculares son sectores de DNA que pueden ser identificados y localizados con mucha precisión en una posición determinada del genoma del organismo en cuestión. Pueden analizar DNA proveniente del núcleo, del cloroplasto o de las mitocondrias. Para que los marcadores moleculares sean útiles deben de estar distribuidos en todos los cromosomas. Para que cualquier característica pueda ser identificada con genes marcadores se considera que debería haber un marcador cada diez *centimorgans* (cM) (IPGRI, 2003).

Los marcadores moleculares de DNA ofrecen muchas ventajas que los hacen especialmente atractivo en los estudios de la diversidad y las relaciones de parentesco. Entre las principales ventajas de estos marcadores encontramos las siguientes: 1) Se encuentran libres de los efectos ambientales y pleiotrópicos. Los marcadores moleculares no exhiben plasticidad fenotípica, mientras que los marcadores morfológicos y bioquímicos pueden variar en diferentes ambientes. Los caracteres de DNA tienen una mejor posibilidad de proporcionar rasgos homólogos. La mayoría de los marcadores morfológicos o bioquímicos, por el contrario, están bajo

control poligénico, y sujetos a control epistático y modificaciones ambientales (plasticidad); 2) Un número potencialmente ilimitado de marcadores independientes están disponibles, a diferencia de los datos morfológicos o bioquímicos; 3) Los caracteres de DNA pueden ser más fácilmente evaluados y registrados como estados discretos de alelos o pares de bases de DNA, mientras que algunos datos de las evaluaciones morfológicas, bioquímicas y de campo deben de ser registrados como caracteres de variación continua que son menos adecuados para métodos analíticos robustos; 4) Muchos marcadores moleculares son selectivamente neutros. Estas ventajas no implican que otros datos más tradicionales usados para caracterizar la biodiversidad no sean valiosos. Por el contrario, los datos morfológicos, ecológicos y otros tradicionales seguirán proporcionando información práctica y a menudo crítica necesaria para caracterizar a los recursos genéticos (Crawford, 1990).

Entre los usos más comunes de los marcadores moleculares encontramos los siguientes: en la caracterización molecular o genotipificación; para construir mapas genéticos; en la localización de genes en los cromosomas; se aplican en el estudio del origen y evolución de las especies; la estimación de la diversidad genética y las relaciones de parentesco; para la caracterización taxonómica; para determinar duplicados y vacíos en las colecciones de germoplasma, y así facilitar su uso y manejo; en la identificación y diferenciación varietal; para la caracterización genética de las poblaciones y para asegurar la transmisión de genes deseables ligados a los marcadores durante la selección (IPGRI, 2003).

Debido a los rápidos avances en el campo de la genética molecular, diferentes técnicas han surgido para analizar la variación genética en las últimas décadas (Karp *et al.*, 1996; Schlotterer, 2004). Estos marcadores genéticos moleculares pueden diferir con respecto a las características importantes, tales como la abundancia genómica, nivel de polimorfismo detectado, especificidad de locus, reproducibilidad, requisitos técnicos e inversión financiera. Ningún marcador es superior a todos los

demás para un amplio rango de aplicaciones. El marcador genético más adecuado dependerá de la aplicación específica, el supuesto nivel de polimorfismo a evaluar, la presencia de suficientes facilidades y conocimientos técnicos, y las limitaciones de tiempo y recursos financieros. Las principales propiedades y características de cada marcador, necesarias de conocer antes de su elección, se resumen en la tabla 7.

Tabla 7. Características relevantes de los principales marcadores. Boletín técnico número 10 del Instituto Internacional de Recursos Genéticos Vegetales (IPGRI, 2003)

Característica del Marcador	Aloenzimas	RFLP	Mini - satélites	PCR sequencing	RAPD	SSR	AFLP
Abundancia genómica	Baja	Alta	Media	Baja	Alta	Alta	Alta
Nivel de polimorfismo	Baja	Media	Alta	Baja	Media	Alta	Media
Especificidad de locus	Si	Si	Si/No	Si	No	Si	No
Codominancia alélica	Si	Si	Si/No	Si	No	Si	Si/No
Reproducibilidad	Alta	Alta	Alta	Alta	Baja	Alta	Media-Alta
Demanda técnica	Baja	Alta	Alta	Alta	Baja	Baja-Media	Media
Costos operacionales	Baja	Alta	Alta	Alta	Baja	Baja	Media
Costos de desarrollo	Baja	Media-Alta	Media-Alta	Alta	Baja-Media	Alta	Baja
Cantidad de DNA	-	Alta	Alta	Baja	Baja	Baja	Media
Automatización	No	No	No	Yes	Yes	Yes	Yes

Los mejores marcadores moleculares deben de ser polimórficos, es decir deben presentar varios alelos diferenciables por locus, alta heredabilidad, la influencia ambiental debe de ser nula y no deben de interaccionar con el ambiente. Asimismo, deben ser reproducibles, de herencia simple, de preferencia con alelos codominantes y sin epistasis. No deben de estar asociados con un factor adaptativo, es decir deben de ser selectivamente neutros y estar bien distribuidos por todo el genoma. Además

deben ser de fácil registro y análisis; no expuestos a errores metodológicos; y económicos (Sevilla y Holle, 2004).

Todos los marcadores moleculares se basan en dos técnicas básicas: el uso de enzimas de restricción y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). A continuación se mencionan los más importantes, en relación a esta investigación:

II.6.1. RFLP

El Polimorfismo de la Longitud de los Fragmentos de Restricción o RFLP por sus siglas en inglés *Restriction Fragment Length Polimorphism* son bandas que corresponden a fragmentos de DNA generalmente entre 2 a 10 Kb (Kilo base) de longitud, que resultan de la digestión del DNA genómico con enzimas de restricción. Los fragmentos de DNA son separados por electroforesis en un gel de agarosa para luego ser detectados por hibridación con una sonda de DNA marcada mediante la técnica de *Southern Blot*. El marcaje de dicha sonda puede ser con isótopos radioactivos o colorantes no radioactivos como digoxigenina o fluoresceína. Las sondas RFLP locus-específicas consisten en secuencias homólogas de una región cromosomal específica. La variación en la secuencia de DNA afecta la ausencia o presencia del reconocimiento por las enzimas de restricción, y las inserciones y deleciones entre dos sitios de restricción, forman la base de los polimorfismos de longitud.

Entre las ventajas de los RFLPs es que son marcadores codominantes, de gran reproducibilidad, moderadamente polimórficos, abundantes en el genoma y tienen una distribución al azar. Entre las desventajas encontramos que el procedimiento para generarlos es laborioso y demanda tiempo, y son caros. Se requieren de sondas prediseñadas y es necesaria gran cantidad de DNA para digerirlo con las enzimas de restricción. No es adecuado para automatizarlo (Neale y Williams, 1991).

II.6.2. RAPD

El DNA Polimórfico Amplificado al Azar (*Ramdon Amplified Polymorphic DNA*) son fragmentos de DNA amplificados por PCR usando pequeños iniciadores (por lo general de 10 pares de bases) de secuencia aleatoria. Estos oligonucleótidos sirven como iniciadores *Forward* y *Reverse* a la vez, y usualmente amplifican fragmentos de 1 a 10 regiones genómicas en simultáneo. Los fragmentos generados, por lo general en un rango de 0.5 – 5 Kb, son separados por electroforesis en un gel de agarosa, luego los polimorfismos son detectados, por coloración con bromuro de etidio, como la presencia o ausencia de bandas de un tamaño particular. Los polimorfismos se pueden deber a la presencia de variación en el sitio de unión de *los primers* (iniciadores) o por la diferencia de tamaño de los fragmentos amplificados (Williams, 1990).

Entre las ventajas que resaltan para estos marcadores es que son rápidos y fáciles de trabajar. Requieren poca cantidad de DNA y no se necesita de una secuencia específica para sus iniciadores. Son marcares abundantes y distribuidos aleatoriamente en el genoma. La principal desventaja de los RAPDs es su baja reproducibilidad, por lo que se requieren protocolos bastante estandarizados. Son marcadores dominantes; no son locus específicos, por lo que las bandas de igual tamaño no necesariamente son homólogas (Karp *et al.*, 1997).

II.6.3. SSR

Los microsatélites o SSR (*short sequence repeat*) son motivos cortos repetidos en tándem, de 1 a 6 pares de bases (Figura 5). El polimorfismo de estos marcadores se basa principalmente en las variaciones existentes del número de las unidades repetitivas de los alelos de un mismo locus microsatélite (Ferreira y Grattapaglia, 1998). Se cree que los errores ocurridos durante la replicación del DNA originan este comportamiento (Provan *et al.*, 1996).

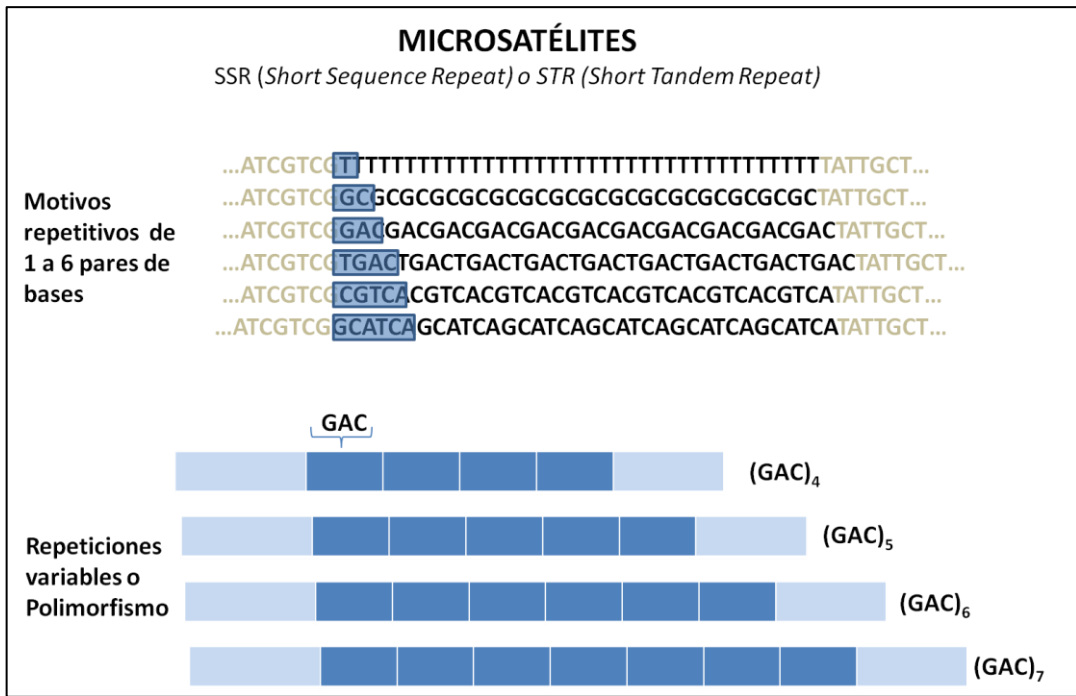


Figura 5. Motivos repetitivos y polimorfismo de los Microsatélites o SSR.

Cuando la hebra negativa se está sintetizando ésta se repliega sobre sí misma, forma un lazo, entonces la polimerasa completa este vacío produciendo un incremento en el número de repeticiones. En cambio cuando la hebra positiva es la que se repliega, se produce una disminución de ese número (Moxon y Wills, 1999). Si las secuencias nucleotídicas en las regiones flanqueantes, que son altamente conservadas, de los microsatélites son conocidas, entonces se pueden diseñar iniciadores específicos (generalmente de 20 – 25 pares de base) para amplificar el microsatélite por PCR. Los microsatélites y sus regiones flanqueantes pueden ser identificados construyendo librerías genómicas de pequeños insertos, para luego evaluar dicha librería con oligonucleótidos marcados sintéticos que posean motivos repetitivos frecuentes en los microsatélites, finalmente los clones positivos son secuenciados. Alternativamente los microsatélites pueden ser identificados evaluando las bases de datos de secuencias para encontrar motivos repetitivos microsatélites y diseñar iniciadores específicos para sus regiones adyacentes.

Las ventajas del uso de microsatélites incluyen la codominancia de los alelos producidos (por lo que son altamente informativos), alta variabilidad en sus loci, una

gran abundancia genómica en los eucariotas así como una distribución aleatoria por todo el genoma (Morgante *et al.*, 2002). Como las demás técnicas basadas en PCR requiere una pequeña muestra de DNA (10 – 100ng) por reacción. Como los *primers* son bastante específicos y de gran tamaño, no se requiere DNA de gran calidad. Se pueden hacer múltiples reacciones de microsatélites en un PCR y separarlos electroforéticamente en un gel, siempre y cuando los productos de diferentes loci no se sobrelapen (Ghislain *et al.*, 2004). Se puede automatizar el registro de los microsatélites mediante secuenciadores automáticos.

Una de las principales desventajas de los microsatélites son los altos costos involucrados en su desarrollo si las secuencias de los iniciadores adecuados para la especie de interés no están disponibles, lo que dificulta su aplicación en grupos no estudiados. Los alelos nulos que pueden generarse por mutaciones en el sitio de anclaje de los *primers* son otra desventaja ya que pueden alterar las frecuencias alélicas y subestimar la heterocigosidad. La homoplasia es otro fenómeno importante que puede estar ocurriendo en los microsatélites ya que se pueden dar mutaciones puntuales dentro de los motivos repetitivos, lo que estaría subestimando la divergencia genética. Las bandas *stutter* o tartamudeos también son frecuentes, éstas se deben al fenómeno de *slippage* o “resbalón” de la DNA polimerasa durante el PCR, lo que dificulta la correcta interpretación de los resultados.

II.6.4. AFLP

Los AFLPs (*Amplified Fragment Length Polymorphism* o Polimorfismo de la Longitud de Fragmentos Amplificados) son fragmentos de DNA de 80 a 500 pares de bases obtenidos de la digestión con enzimas de restricción, seguido de la ligación de oligonucleótidos adaptadores a los productos de digestión y una amplificación selectiva por PCR. Los iniciadores de PCR consisten en una secuencia central (parte del adaptador), una secuencia específica para enzimas de restricción y de 1 a 5

nucleótidos selectivos. Los patrones de bandas AFLP son el resultado de las variaciones en los sitios de restricción, así como de la región involucrada. Con esta técnica se generan múltiples fragmentos en simultáneo pertenecientes a diferentes sitios genómicos, que luego son separados en geles de poliacrilamida y registrados como dominantes (Vos *et al.*, 1995).

Las ventajas que brindan los AFLPs descansan en su abundancia genómica, reproducibilidad considerable, la generación de muchas bandas informativas por reacción (50 a 100), su amplio rango de aplicaciones, y el hecho de que no se necesitan datos de secuencias para la construcción de los iniciadores. No necesariamente están distribuidos aleatoriamente por todo el genoma, como si pueden estar ubicados en ciertas regiones específicas como los centromeros (Young *et al.*, 1999). Entre las desventajas encontradas en los AFLPs están las siguientes: se requiere una buena calidad de DNA purificado, la dominancia de los alelos, y la posibilidad de no homología entre fragmentos que hayan comigrado pertenecientes a diferentes loci.

II.6.5. SNPs

Los polimorfismos de un solo nucleótido o SNP por sus siglas en inglés *Single Nucleotide Polimorphism* son un tipo de polimorfismo que se da por la diferencia en una simple posición nucleotídica, por ejemplo sustituciones, deleciones o inserciones de un solo nucleótido. Por lo general ocurren en regiones no codificantes. La mayoría de este tipo de polimorfismo presenta sólo dos tipos de alelos (bialélica), y por ello son referidas algunas veces como marcadores bialélicos. Con la presencia solamente de dos alelos, la máxima heterocigosidad esperada para cada SNP es de solamente 50%, siendo por lo tanto menos informativos, por ejemplo, que las regiones microsatélites, las cuales generalmente presentan múltiples alelos y sus valores de heterocigosis

superan el 70%. Asimismo los alelos de un SNPs deben de tener una frecuencia no menor de un 1%, caso contrario se consideraría solo como una mutación puntual.

Aunque muchos de los SNPs se localizan en regiones no codificantes, un número importante de estos que corresponden a sitios de genes (codificantes) se han asociado a enfermedades u otra expresión fenotípica. Su alta frecuencia en el genoma y su baja tasa de mutación, hacen que se consideren como elementos deseables para la construcción de mapas genéticos. Sin embargo, para la construcción de dichos mapas son requeridos más marcadores SNPs con respecto a otros. En el caso del genoma humano, donde mayoritariamente se han estudiado los SNPs, se estima que un SNP con una heterocigosis por encima del 30% se encuentra presente cada 1.3 Kb (Kwok *et al.*, 1996).

Las principales limitaciones de los SNPs son las siguientes: los niveles de polimorfismo presentes en los SNPs son bajos en comparación a otros marcadores, las técnicas de detección y genotipificación son relativamente costosas y laboriosas, y la disponibilidad de bases de datos e información para diferentes especies, a excepción del hombre, son limitadas.

II.7.1. Marcadores moleculares y microsatélites en papa

En el caso de la papa existen varios estudios que han utilizado marcadores moleculares para distintos fines. Así por ejemplo está el trabajo pionero de Hosaka y colaboradores utilizando marcadores RFLP de DNA de cloroplastos para evaluar la diversidad genética de cultivares ancestrales andinos (Hosaka *et al.* 1984; Hosaka 1986, 1995; Hosaka y Hanneman, 1988).

También han sido llevados a cabo estudios de mapeo genético en papa para rasgos específicos usando marcadores RFLP y AFLP. Algunos de estos rasgos mapeados incluyen el color de la pulpa (Bonierbale *et al.*, 1988), forma del tubérculo y color de flores (van Eck *et al.*, 1993). Asimismo, se han realizado estudios de mapeo de Locus

de caracteres cuantitativos (QTLs) para resistencia a tizón tardío (Borman *et al.*, 2004) y resistencia al nemátodo quístico de papa. Aunque al principio los mayores esfuerzos para el mapeo descansaban sobre los RFLPs usando sondas de tomate (Tanksley *et al.*, 1992), los últimos mapas se han basado en más de 10,000 marcadores AFLP (van Os *et al.*, 2006). Recientemente, el enfoque del desequilibrio de ligamiento también ha sido utilizado para la construcción de mapas moleculares de papas tetraploides.

Los primeros trabajos en el Perú que involucraron el uso de marcadores moleculares fueron realizados en el CIP, donde se trabajó con marcadores RAPD para analizar la diversidad genética de *S. phureja* y construir una colección núcleo de esta especie cultivada (Ghislain *et al.*, 1999). Las técnicas de RFLP y AFLP, aunque exitosas, sufren de ciertas deficiencias que incluyen procedimientos largos, altos costos y el uso de radioactividad, entre otras; haciéndolas actualmente impopulares (Grover *et al.*, 2009). Por lo tanto, los microsatélites han sido mejor considerados para los estudios en papa que involucren marcadores moleculares, además de ser más robustos y confiables para la determinación de la diversidad genética.

El desarrollo de microsatélites en papa se ha basado en gran medida en las secuencias de DNA disponibles en base de datos públicas (Provan *et al.*, 1996; Schneider y Douches, 1997; Ghislain *et al.*, 2004; Feingold *et al.*, 2005; Tang *et al.*, 2008). Estos marcadores han sido aplicados para mapeo genómico de la papa, etiquetado genético, caracterización del germoplasma y clasificación taxonómica (Milbourne *et al.*, 1998; Ashkenazi *et al.*, 2001; Ghislain *et al.*, 2004; Feingold *et al.*, 2005; van Os *et al.*, 2006; Spooner *et al.*, 2007). Los marcadores microsatélites en papa se vienen utilizando desde mediados de la década del 90 con el trabajo de Provan *et al.*, (1996) que utilizó 22 pares de iniciadores microsatélites diseñados a partir de secuencias, disponible en bases de datos, no codificantes de genes de papa y además 4 iniciadores microsatélites de tomate. Con ellos se pudo diferenciar 18 cultivares mejorados de papas tetraploides.

Milbourne *et al.* (1997) compararon la capacidad de los tres sistemas de marcadores más utilizados (AFLP, RAPD y SSR) para diferenciar variedades de papas tetraploides europeas, llegando a la conclusión de que los microsatélites presentaban mayor polimorfismo y mayores ventajas en comparación con los demás marcadores. Más adelante, Milbourne *et al.* (1998) desarrollaron 112 marcadores microsatélites explotando diferentes recursos que involucraron librerías genómicas enriquecidas, librerías en base a cDNA y bases de datos de secuencias del genoma de la papa. De éstos, 65 microsatélites pudieron ser integrados a un mapa genético preexistente de papa en base a RFLPs. Posteriormente, Ashkenazi *et al.* (2001) también utilizaron estos recursos además de utilizar microsatélites de tomate previamente publicados, confirmando una vez más el uso de SSR para identificar cultivares de papa.

En el 2005, Feingold *et al.*, reportaron un alto grado de polimorfismo en un grupo de 30 cultivares modernos de América y Europa, usando 94 microsatélites cuyos iniciadores se derivaron a partir de EST (*expressed sequence tag*). De éstos, resultaron ser útiles un total de 61 SSR, que además fueron localizados en mapas genéticos ya existentes.

Ghislain *et al.*, (2004, 2008) caracterizaron alrededor de 1000 cultivares usando marcadores microsatélites, y desarrollaron un *kit* de identidad genética útil para la caracterización de los recursos genéticos de papa. Resultados similares en la caracterización genética de varios cultivares de papa fueron obtenidos por Reid *et al.* (2009) usando 9 SSR desarrollados en el Departamento de Agricultura en Escocia. En un trabajo más reciente Grover *et al.*, (2009) lograron desarrollar 30 SSR a partir de ESTs y librerías genómicas enriquecidas, potencialmente útiles para estudios genéticos y taxonómicos en papa y genomas relacionados.

II.7.2. Set de microsatélites para la identificación genética de la papa

El grupo de SSR para la identificación genética de papa (PGI – *kit*), fue desarrollado en el CIP (Ghislain *et al.*, 2004) con el fin de usarlo para caracterizar de manera rápida

y eficiente diversas variedades de papa cultivadas y silvestres. Sin embargo, con el tiempo este set de microsatélites ha sido modificado, tal es así que en el 2008 el mismo grupo hizo una reevaluación de éstos y otros SSR para obtener un set de marcadores más robustos y eficientes para la caracterización y mapeo genético.

Este nuevo set fue desarrollado a partir de la evaluación de 88 microsatélites provenientes de 4 fuentes: 1) 22 pertenecientes al PGI *kit* anterior (Ghislain *et al.* 2004); 2) 13 de ESTs desarrollados en el *Scottish Crop Research Institute* (Milbourne *et al.*, 1998); 3) 30 nuevos identificados en el CIP usando la base de datos de ESTs de papa del Instituto de Investigación Genómica TIGR (<http://www.tigr.org/>); y 4) 23 de la Universidad de Idaho (Feingold *et al.*, 2005).

Con ellos se caracterizaron 742 entradas de la colección del CIP correspondientes a distintas variedades que incluían todas las especies de papa cultivadas. Asimismo se realizó el análisis de ligamiento para mapear la posición de los SSRs en la población analizada. Los resultados obtenidos permitieron la selección de 24 marcadores microsatélites útiles para la caracterización del germoplasma, debido a su alto contenido de información polimórfica (He), amplia cobertura del genoma (dos SSR por cromosoma), separación de por lo menos 10 cM, de locus único y de buena calidad de amplificación, tal como se determina por la claridad y la reproducibilidad del ensayo.

Fue con este set de marcadores SSR que se trabajó en el presente estudio debido a las bondades mencionadas y por los protocolos estandarizados para su amplificación (CIP, 2008).

III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

III.1. Hipótesis

El análisis con marcadores microsatélites permite caracterizar molecularmente a las variedades de papas cultivadas más importantes del Perú.

III.2. Objetivos

III.2.1. Objetivo general

Caracterizar las variedades de papas cultivadas más importantes del Perú mediante el análisis de 23 marcadores moleculares microsatélites.

III.2.2. Objetivos específicos

1. Estimar la diversidad genética de las variedades de papas cultivadas más importantes del Perú.
2. Comparar la diversidad genética de las papas procedentes de distintas regiones del Perú.
3. Comparar la diversidad genética de las papas nativas y mejoradas peruanas.
4. Determinar la variación genética dentro y entre poblaciones de papas procedentes de distintas regiones del Perú.
5. Determinar la variación genética dentro y entre poblaciones de papas nativas y mejoradas peruanas.
6. Determinar la relación genética entre las variedades de papas cultivadas del presente estudio mediante el análisis de agrupamiento.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

IV.1. Materiales

IV.1.1. Material biológico

El total de muestras evaluadas correspondió a 168 variedades nominales de papa cultivada (*Solanum* spp.), entre nativas y mejoradas (ver anexo II). 160 variedades de dicha muestra provinieron de distintas localidades del Perú: Cajamarca y Lambayeque por el norte, Huánuco, Huancavelica, Junín y Quilcas (Junín) por el centro; y Paucartambo (Cuzco I), Anta (Cusco II), Illpa (Puno) por el sur (Figura 6). Asimismo, se incluyeron 8 variedades mantenidas en el CIP: Calhua Rosada, China Runtush, Ambar, Chingos, Maria Cruz, EE-2057, Chapiña y Cceccorani. Todas ellas, a excepción de las de Junín, habían sido previamente caracterizadas morfológica y cromosómicamente (por citometría de flujo), e identificadas taxonómicamente (Huamán, 1986) en el CIP. Estas papas fueron sembradas y cultivadas en la estación La Victoria del CIP en Huancayo a 3250 msnm. Cabe mencionar que el total de la muestra se utilizó para el análisis por categoría (nativa o mejorada), mientras que para el análisis por regiones (Norte, Centro y Sur) se utilizaron solo 160 variedades (a excepción de las provenientes del CIP).

IV.1.2. Enzimas y kits

Iniciadores, 23 pares, del PGI Kit (Ghislain *et al.*, 2008) con (*Forward*) y sin (*Reverse*) cola M13 (Invitrogen®).

Iniciador *Forward* M13 fluorescente en longitudes de onda de 700 nm y 800 nm (LI-COR, USA).

Marcadores de tamaño estándar fluorescentes (fragmentos de tamaño estándar: 50pb–350pb) (LI-COR, USA).



Figura 6. Ubicación geográfica de las variedades de papas cultivadas más importantes del Perú.

IV.1.3. Software de análisis de datos

Darwin 5.0 (CIRAD-FLHOR 2009).

Arlequín 3.5.1.2 (Swiss Institute of Bioinformatics).

Saga Generation 2.0 (Automated Microsatellite Software LI-COR Biosciences, 2004).

Microsoft Office Excel 2003.

STATA 11.1 (StataCorp. 2009. Stata Statistical Software: Release 11)

IV.2. Métodos

IV.2.1. Extracción de DNA

La extracción del DNA genómico de las papas se realizó a partir de las hojas apicales de las plantas y se hizo a pequeña escala, utilizando el método CTAB modificado de Doyle y Doyle (1990).

Para homogenizar el tejido se cortó y colocó las hojas (0.20 – 0.22 g) en microtubos estériles de 2 mL de capacidad. Luego se colocaron esferas de cerámica estériles en los tubos. Se agregaron 750 μ L de *buffer* de extracción CTAB 2X y 2 μ L de mercaptoetanol. El paso siguiente fue colocar las arandelas de caucho al borde de cada tubo y moler por 20 segundos en la trituradora (*Savant fast prep*) dos veces. Se incubaron las muestras a 65°C por 45 minutos. Pasado 5 minutos del inicio de la incubación se agitaron los tubos 3 veces para después agitarlos 2 veces más cada 20 minutos. Para terminar, se retiraron las muestras de la incubadora y se dejaron enfriar a temperatura de ambiente.

Para la separación de proteínas y polisacáridos primero se agregó 750 μ L de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) y se agitaron los tubos hasta homogenizar el contenido. Luego se centrifugó a 14,000 rpm por 5 minutos y se transfirió el sobrenadante (aprox. 650 μ L) a microtubos estériles de 1.5 mL. Se agregó 70 μ L de CTAB 10 X (a 65°C) y se agitó hasta homogenizar. Luego añadimos 650 μ L de cloroformo: etanol isoamílico (24:1) y agitamos hasta homogenizar completamente. Se

centrifugó a 14,000 rpm por 5 minutos y se transfirió el sobrenadante (aprox. 550 μ L) a microtubos estériles de 1.5 mL.

Para la precipitación de los ácidos nucleicos se agregó 500 μ L de isopropanol frío y se agitó suavemente por 10 segundos. Se incubaron los tubos a -20°C por 30 minutos y se centrifugó a 14,000 rpm por 20 minutos. Luego se decantó el isopropanol con cuidado de no perder el *pellet* y se dejaron los tubos invertidos por 1 minuto sobre papel toalla. Para la purificación de los ácidos nucleicos, se agregó 100 μ L de etanol al 70% y se desprendió el *pellet* de la base del tubo. Se centrifugó a 14 000 rpm por 15 minutos y se decantó con cuidado de no perder el *pellet*.

Se dejó los tubos invertidos por 30 segundos sobre el papel toalla y agregó 1 mL de etanol al 90% con el fin de desprender el *pellet* de la base del tubo para luego centrifugar a 14,000 rpm por espacio de 10 minutos y decantar el etanol con cuidado de no perder el *pellet*. Se puso los tubos invertidos por 10 segundos sobre el papel toalla luego de lo cual se secó las muestras en el liofilizador por 10 minutos.

Para la resuspensión de los ácidos nucleicos se añadió a cada *pellet* 75 μ L de solución T₁₀E₁ (anexo I). También se agregó entre 1 a 2 μ L de ARNasa 10 ng/ μ L (libre de DNAsa), se agitó suavemente y se incubó a 37°C *overnight* a 4°C para una disolución total del *pellet*.

IV.2.2. Electroforesis en geles de agarosa del DNA extraído de las muestras

Para evaluar si el DNA extraído se encontraba degradado se llevó a cabo una electroforesis en gel de agarosa al 1%, utilizando como patrón de referencia al fago *Lambda* digerido con la enzima de restricción *Pst I*. Para ello se corrió 1 μ L del DNA a evaluar disuelto en 9 μ L de buffer de carga SALB 1X (azul de bromofenol, sucrosa y xilen cianol). La electroforesis se llevó a cabo con una solución tampón TBE 1 X y bromuro de etidio (10mg/ml), a 100 voltios durante dos horas aproximadamente.

Luego, mediante un transiluminador con luz UV fue posible observar y registrar el DNA extraído de cada muestra (ver anexo III).

IV.2.3. Cuantificación de la concentración del DNA extraído de las muestras

Para cuantificar las muestras de DNA extraído se utilizó un Fluorímetro TBS-380 (Turner BioSystems, USA), para lo cual añadimos a las muestras el reactivo Pico – Green que interacciona con la doble hebra de DNA y nos permitió la detección con el equipo. Se utilizó DNA de salmón de concentración conocida (500 ng/mL) como patrón para determinar la concentración de las muestras.

IV.2.4. Dilución de la concentración de DNA de las muestras

Una vez determinada la concentración de cada muestra de DNA se procedió a diluirlas añadiéndoles agua libre de nucleasas (*nuclease free water* “NFW”) hasta una concentración final de 100 ng/μL para la caja de dilución *stock* y hasta 10 ng/μL para la caja de dilución *working solution* con la que se trabajó las amplificaciones. La dilución de 100 ng/μL se almacenó a –20°C y la de 10 ng/μL a 4°C.

IV.2.5. Preparación de los marcadores de tamaño estándar de cada SSR

Para construir los marcadores de tamaño estándar o *ladders* para cada uno de los 23 SSR del PGI Kit (Ghislain *et al.*, 2008), que contienen alelos tamaño (pb) conocido, se tuvieron que mezclar ciertos genotipos del banco de DNA del CIP. Primero se hizo una dilución de cada genotipo según el protocolo PGI Kit: *protocols and reference ladders* (CIP, 2008) y se mezclaron en iguales proporciones. El volumen final de la mezcla fue determinado por el número de reacciones a realizarse. La amplificación de estas mezclas de DNAs se realizó usando un protocolo modificado del CIP de amplificación estándar (CIP, 1997), para marcadores SSR, utilizando el iniciador *Forward* M13 Fluorescente en longitudes de onda de 700 y 800 nm (LI-COR).

La electroforesis de estos *ladders* se realizó en el Analizador Automático de DNA LI-COR Modelo 4300 (LI-COR Biosciences). Finalmente, para comprobar el tamaño correcto de los alelos de cada *ladder* se utilizó el programa Saga Generation 2.0.

IV.2.6. Amplificación de las regiones microsatélites

IV.2.6.1. Preparación del DNA templado

El DNA genómico usado como molde o templado debía tener una concentración de 10 ng/ μ L para la amplificación. Por esta razón, se diluyó la cantidad requerida de DNA de cada muestra en agua libre de nucleasas hasta un volumen total de 400 μ L. Estas diluciones fueron hechas en cajas de dilución de 96 pocillos de 1mL de capacidad y almacenadas a 4°C.

IV.2.6.2. Protocolo de amplificación

Las amplificaciones de los microsatélites se realizaron según el protocolo estándar del CIP (2008), que es una modificación para iniciadores fluorescentes (Ghislain *et al.*, 2008). Primero se preparó la mezcla de la reacción o *Master mix* (tabla 8) y se repartieron 5 μ L de ésta en todos los pocillos de la placa de reacción (Placas de policarbonato de 96 pocillos para PCR, USA Scientific), luego añadimos 5 μ L de DNA (10 ng/ μ L) de cada muestra.

Tabla 8. Protocolo estándar de amplificación de microsatélites

Componentes <i>stock</i>	Volumen (μ L)	Concentración final
NFW	2.5	
<i>Buffer Bob</i> 10X	1	1x
DNTPs 5mM	0.4	0.2mM
F* 1 μ M	0.2	0.02 μ M
R 1 μ M	0.3	0.03 μ M
<i>M13</i> 1 μ M	0.3	0.03 μ M
<i>Taq W</i> 5U/ μ L	0.3	0.15 U/ μ L
DNA templado (10 ng/ μ L)	5	5 ng/ μ L
Volumen total	10	

F* = iniciador *forward* con cola M13

M13 = Iniciador *Forward* M13 Fluorescente en longitudes de onda de 700 o 800nm

Taq W = Taq polimerasa recombinante producida en el CIP

IV.2.6.3. Programa de amplificación

Las amplificaciones se realizaron en los termocicladores, mediante un programa de PCR (Tabla 9), que consistió básicamente en una serie de ciclos que varían en temperatura y tiempo.

El primer ciclo permite una desnaturalización del DNA bicatenario a 94°C. Los siguientes ciclos (de 27 a 33) consisten de 3 temperaturas: 94°C para separar las hebras del DNA molde y del iniciador (desnaturalización), temperatura de hibridación o *annealing*, que dependerá de cada par de iniciadores, y 72°C que es la temperatura óptima en que la Taq polimerasa realiza la síntesis o extensión. El último paso del ciclo es la extensión final y también fue a 72°C.

Tabla 9. Programa de amplificación de los SSRs

Ciclos	temperatura (°C)	Tiempo (min)
1 ciclo	94	4
30 ciclos	94	1
	T° <i>annealing</i>	1
	72	1
1 ciclo	72	7
∞	4	∞

IV.2.6.4. Iniciadores SSR utilizados

Se utilizaron 23 de los 24 iniciadores microsatélites del PGI *kit*, a excepción del marcador STM0019, que ha sido reportado como multilocus, ya que amplifica dos regiones bien diferenciadas a y b (Ghislain *et al.*, 2008). Estos iniciadores han sido mapeados para *Solanum tuberosum*, de manera que abarcan todos los cromosomas y son los que frecuentemente utiliza el CIP para caracterizar molecularmente distintas variedades de papa.

En la tabla 10 podemos observar las principales características de estos marcadores, así como su ubicación genómica.

IV.2.7. Electroforesis de los productos de amplificación

Para ayudar a migrar a las muestras se añadió el *buffer* de carga *Blue Stop Solution* (#839-05630 LI-COR, USA) a los productos de amplificación en una proporción de 1:1 antes de ser cargadas en los geles. Posteriormente, los productos de amplificación fueron separados en geles desnaturalizantes de poliacrilamida: acrilamida 6% y urea 7M (ver anexo I), mediante electroforesis vertical en un sistema analizador automatizado de DNA LI-COR 4300 (LI-COR Biosciences) a 150 Voltios por diferentes periodos de tiempo dependiendo del tamaño esperado de los ampliaciones. Estos tiempos variaron entre 70 a 100 minutos aproximadamente. Como marcadores de tamaño molecular se utilizaron a los *ladders* de fragmentos de tamaño estándar LI-COR y los de cada SSR del PGI *kit* preparados previamente.

IV.2.8. Detección y registro de los patrones de bandeo

Los alelos generados por cada microsatélite fueron detectados y registrados mediante el programa Saga Generation 2 (Automated Microsatellite Software, <http://www.licor.com>). Asimismo, la medición de éstos se realizó gracias a los *ladders* o marcadores de tamaño (pb) estándar (LI-COR y PGI Kit).

Los datos obtenidos con el programa Saga 2.0 fueron registrados en una matriz de datos Excel. En vista de que la población fue heterogénea en cuanto a ploidia ($2n = 2x$ hasta $2n = 5x$) y para facilitar el posterior análisis de los datos se optó seguir una codificación binaria en el registro de los alelos. De esta manera, se consideró el número 1 si un alelo se encontraba presente, y 0 para su ausencia o presencia de alelos nulos. Adicionalmente se nominó como 9 a los datos del registro que no fueron posibles de obtener (*missing data*)

Tabla 10. Iniciadores SSR del PGI *Kit* utilizados y algunas de sus características (Ghislain, 2008)

Código CIP	Código SCRI	Unidad repetitiva	Iniciador <i>Forward</i> 5' - 3' Iniciador <i>Reverse</i> 5' - 3'	Cromosoma	tamaño (pb)	T _{unión} (°C)
S027	STM1064	(TA) _n (TG) _n GT(TG) _n	GTTCTTTTGGTGGTTTTCTCT TTATTTCTCTGTTGTTGCTG	II	201 - 213	55
S029	STPoAc58	(TA) _n	TTGATGAAAGGAATGCAGCTTGTG ACGTTAAAGAAGTGAGAGTACGAC	V	243 - 263	57
S036	STM1053	(TA) _n (ATC) _n	TCTCCCCATCTTAATGTTTC CAACACAGCATAACAGATCATC	III	170 - 196	53
S042	STM0037	(TC) _n (AC) _n AA (AC) _n (AT) _n	AATTTAACTTAGAAGATTAGTCTC ATTTGGTTGGGTATGATA	XI	87 - 133	52
S052	STM0031	(AC) _n ...(AC) _n GCAC (AC) _n (GCAC) _n	CATACGCACGCACGTACAC TTCAACCTATCATTTTGTGAGTCG	VII	185 - 211	53
S081	STM1104	(TCT) _n	TGATTCTCTTGCCACTGTAATCG CAAAGTGGTGTGAAGCTGTGA	VIII	178 - 199	53
S084	STM1052	(AT) _n GT(AT) _n (GT) _n	CAATTTTCGTTTTTTCATGTGACAC ATGGCGTAATTTGATTTAATACGTAA	IX	214 - 263	50
S101	STM1106	(ATT) _n	TCCAGCTGATTGGTTAGGTTG ATGCGAATCTACTCGTCATGG	X	145 - 211	51
S114	STM5114	(ACC) _n	AATGGCTCTCTGTATGCT GCTGTCCCAACTATCTTTGA	II	297 - 322	60
S121	STM5121	(TGT) _n	CACCGGAATAAGCGGATCT TCTTCCCTTCCATTTGTCA	XII	297 - 309	50
S127	STM5127	(TCT) _n	TTCAAGAATAGGCAAAACCA CTTTTTCTGACTGAGTTGCCTC	I	248 - 291	55
S179	STG0001	(CT) _n	CAGCCAACATTTGTACCCCT ACCCCACTTGCCATATTTT	XI	137 - 163	58
S188	STG0010	(TG) _n	CGATCTCTGCTTTGCAGGTA GTTTCATCACTACCGCCGACT	III	175 - 195	58
S194	STG0016	(AGA) _n	AGCTGCTCAGCATCAAGAGA ACCACCTCAGGCACTTCATC	I	137 - 174	55
S203	STG0025	(AAAC) _n	TGGAATCCGAATTACGCTCT AGGTTTTACCACTCGGGCTT	X	208 - 223	56
S209	STI0001	(AAT) _n	CAGCAAAATCAGAACCCGAT GGATCATCAAATTCACCGCT	IV	194 - 215	60
S210	STI0003	(ACC) _n	ACCATCCACCATGTCAATGC CTCATGGATGGTGTCAATTGG	VIII	137 - 188	60
S211	STI0004	(AAG) _n	GCTGCTAAACACTCAAGCAGAA CAACTACAAGATTCCATCCACAG	VI	83 - 126	60
S214	STI0012	(ATT) _n	GAAGCGACTTCCAAAATCAGA AAAGGGAGGAATAGAAACCAAAA	IV	183 - 234	56
S216	STI0014	(TGG) _n (AGG) _n	AGAAACTGAGTTGTGTTTGGGA TCAACAGTCTCAGAAAACCTCT	IX	127 - 157	54
S224	STI0030	(ATT) _n	TTGACCCTCCAACATATAGATTCTC TGACAACCTTTAAAGCATATGTCAGC	XII	94 - 137	58
S225	STI0032	(GGA) _n	TGGGAAGAATCCTGAAATGG TGCTCTACCAATTAACGGCA	V	127 - 148	61
S226	STI0033	(AGG) _n	TGAGGGTTTTTCAGAAAGGGA CATCCTTGCAACAACCTCCT	VII	131 - 155	61

IV.2.9. Análisis de los resultados

Se realizaron básicamente dos tipos de análisis con los datos generados por los microsatélites; el primero consistió en comparar los distintos índices de diversidad genética de las variedades procedentes de distintas regiones (Norte, Centro y Sur), y el segundo comparando a las variedades según su categoría (nativas o mejoradas).

IV.2.9.1. Determinación de la riqueza alélica

La riqueza alélica de la muestra se determinó a partir de la matriz de datos Excel, contabilizando el número de alelos distintos en cada población. También en esta matriz se determinaron los alelos comunes y exclusivos de las poblaciones.

IV.2.9.2. Determinación de la Heterocigosidad esperada (He)

La Heterocigosidad esperada (He) para fue calculada mediante la fórmula corregida de Nei (Nei, 1987), expresada como:

$$He_i = \frac{n}{n-1} \left(1 - \sum_{j=1}^m x_j^2\right)$$

Donde:

n = número de individuos en la población

x_j = frecuencia del *j*-ésimo alelo en el locus *i*

m = número de alelos observados en el locus *i*

He_i = probabilidad de que 2 alelos tomados al azar de la población sean diferentes en el locus *i*

La He también es llamada diversidad genética de Nei (Nei, 1973). Sin embargo, esta denominación no es del todo apropiada cuando la población no proviene de cruces al azar como es el caso de la papa cultivada. Por lo tanto, la He calculada en el presente estudio solo será una aproximación de la verdadera He. Existen además otras dos razones por las cuales no es posible calcular directamente la diversidad genética en esta muestra. La primera, que la muestra de papas analizadas en el presente estudio proviene de un grupo heterogéneo de especies con ploidias distintas y por lo tanto con

frecuencias génicas poblacionales diferentes. La segunda, que no es posible determinar el dosaje genético en poliploides a través del método utilizado por lo que no es posible determinar las frecuencias génicas pero si las frecuencias alélicas. De este modo, los SSR se analizan como un marcador parcialmente codominante en poliploides y esto conlleva a determinar solo una parte de la diversidad genética de las poblaciones en estudio (Falush *et al.*, 2007; Núñez J. comunicación personal).

Las frecuencias alélicas se calcularon en la matriz de datos Excel por cada microsatélite a partir de la siguiente fórmula:

$$x_j = \frac{n_j}{N}$$

Donde:

x_j = frecuencia del *j*-ésimo alelo en el locus *i* en la población
 n_j = número de repeticiones del alelo *j* en el locus *i*
 N = cantidad total de alelos en el locus *i*

IV.2.9.3. Análisis de agrupamiento

Para determinar la relación genética entre las variedades de papas se empleó el programa Darwin 5.0 (Perrier X. y Jacquemoud Collet, 2006) para la construcción de árboles que representan la estructura de la diversidad basados en métodos de distancia.

Brevemente, se construyeron matrices de disimilitud a partir de la matriz de datos en Excel aplicando el índice de disimilitud de Jaccard el cual varía de 0 (muestras idénticas) a 1 (muestras completamente distintas) y nos calcula la disimilitud entre cada par de muestras tomando en consideración los alelos que estas dos comparten o no. Según el coeficiente de Jaccard, la disimilitud se representa como:

$$d_{ij} = \frac{b + c}{a + (b+c)}$$

Donde:

d_{ij} : disimilitud o distancia genética entre los individuos i y j .

a: número de veces en que ambos individuos tienen presente el mismo carácter comparado

b: número de veces en que el primero de ellos tiene el carácter presente y el segundo ausente

c: número de veces en que el primero de ellos tiene el carácter ausente y el segundo presente

Luego se agruparon a las muestras utilizando el método *Unweighted Neighbor Joining* (unión por vecindad – NJ) para trazar un dendrograma de distancias genéticas cuya topología se basó en la matriz de disimilitud y representa las relaciones de agrupamiento de las diferentes variedades de papas. El método NJ desarrollado por Saitou y Nei (1987) sirve para estimar árboles filogenéticos. Aunque basado en la idea de parsimonia, el método NJ no intenta obtener el árbol más corto posible para un conjunto de datos, más bien, busca obtener el árbol que usualmente es el más cercano al verdadero árbol filogenético (Rohlf, 1997).

Se hizo un remuestreo computacional denominado *bootstrap* que consistió en repetir 1000 veces el agrupamiento, pero eliminando una muestra de manera aleatoria en cada repetición. De esta manera, se determinó el porcentaje de la probabilidad que tiene cada rama de aparecer si se generan un determinado número de dendrogramas eliminando un dato cada vez.

Se analizó este dendrograma desde tres perspectivas: visualizando a las papas por grupo taxonómico, por regiones y por categoría.

La disimilitud, la riqueza alélica y Heterocigosidad esperada (H_e) en conjunto nos darán una idea clara de la diversidad genética de una población. En consecuencia, para comparar la diversidad genética entre regiones o entre categorías es necesario el cálculo de estos estimadores.

IV.2.9.4. Análisis de la Varianza Molecular (AMOVA)

En base a la matriz de datos Excel se calculó y analizó la varianza de las frecuencias génicas dentro y entre poblaciones de papas usando el análisis de varianza molecular (AMOVA) incluido en el programa Arlequín 3.1 (*An integrated software package for population genetics data analysis*: <http://cmpg.unibe.ch/software/arlequin3>. Excoffier *et al.*, 2005).

La estructura genética de las poblaciones fue investigada mediante un sistema de análisis de varianza, como inicialmente la definió Cockerham (1969, 1973). El enfoque del análisis de varianza molecular (AMOVA, Excoffier *et al.*, 1992) esencialmente es similar a otros enfoques basados en el análisis de la varianza de las frecuencias génicas, sin embargo, éste toma en cuenta el número de mutaciones o diferencias entre los haplotipos moleculares (que primero necesitan ser evaluados). Cada una de las variedades de papas analizadas en el presente estudio estuvo representada por un haplotipo.

En AMOVA se divide la varianza total en términos de covarianza (Excoffier *et al.*, 1992): entre grupos (σ^2_a), entre poblaciones dentro de grupos (σ^2_b) y dentro de poblaciones (σ^2_c). Entonces, la varianza total se calcula de la siguiente forma:

$$\sigma^2_t = \sigma^2_a + \sigma^2_b + \sigma^2_c$$

Dichas covarianzas están generadas a partir de la suma de desviaciones de cuadrados (SSD) divididas entre sus grados de libertad (caso de covarianza σ^2_c) u otros factores corregidos (demás covarianzas que tienen un factor de corrección “n”). La suma de estas nos dará la varianza total (tabla 11). La SSD a su vez se deriva de las diferencias o mutaciones entre individuos provenientes de diferentes categorías (entre grupos, entre poblaciones dentro de grupos y dentro de poblaciones). Entonces

las covarianzas dependen básicamente de las diferencias o mutaciones entre individuos.

Cuando se definen grupos de poblaciones se está definiendo una estructura genética particular que será evaluada, en este sentido se realizaron 2 tipos de agrupaciones de las papas: por regiones (Norte, Centro y Sur) y por categoría (nativa o mejorada), luego se realizaron los AMOVA correspondientes.

Tabla 11. Representación de los componentes que definen un AMOVA

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados (SC)	Cuadrados medios esperados
Entre Grupos (G)	G - 1	SC (Entre Grupos)	$\sigma_a^2 + \sigma_b^2 + \sigma_c^2$
Entre Poblaciones (P) dentro de los Grupos	P - G	SC (Entre Poblaciones/ dentro de los Grupos)	$\sigma_b^2 + \sigma_c^2$
Entre Individuos (N) dentro de las Poblaciones	N - P	SC (Entre Individuos/ dentro de los Poblaciones)	σ_c^2
Total	N - 1	SC (Total)	σ_t^2

El AMOVA se realizó comparando a las variedades de papas por regiones así como por su categoría.

IV.2.9.5. Análisis estadístico de datos

El análisis estadístico de los datos se realizó con ayuda del programa STATA 11.1 (Stata Corp. 2009. *Stata Statistical Software: Release 11*. College Station, TX: Stata Corp LP. <http://www.stata.com>). Los cuales básicamente consistieron en prueba de hipótesis entre 2 medias y análisis de varianza (ANOVA) cuando se comparó más de una media.

V. RESULTADOS

V.1. Registro y caracterización de los 23 iniciadores microsatélites

V.1.1. Número de loci amplificados por iniciador

Los 23 microsatélites del PGI Kit analizados resultaron ser todos polimórficos en la población analizada de 168 variedades de papa peruana. El rango de alelos encontrados fue desde 4 hasta 14 (marcadores STG0025 y STG0001, respectivamente). En la tabla 12 se muestra el número, tamaño y frecuencia de cada alelo por microsatélite en la muestra total.

De los 23 microsatélites, 22 amplificaron un solo locus bien definido, mientras que el marcador STM1052, al parecer, amplificó 2 loci separados. Es así que en este microsatélite se observó además una región polimórfica difusa por encima del alelo de 263 pb (rango de tamaño alélico: 214 – 263 pb), en la que se pudo notar polimorfismo. Se trataría entonces de un segundo locus distinto al ya reportado (figura 7). Sin embargo, no se le consideró en el presente análisis ya que la amplificación no fue la óptima para todos los geles y por lo que el registro resultó difícil.

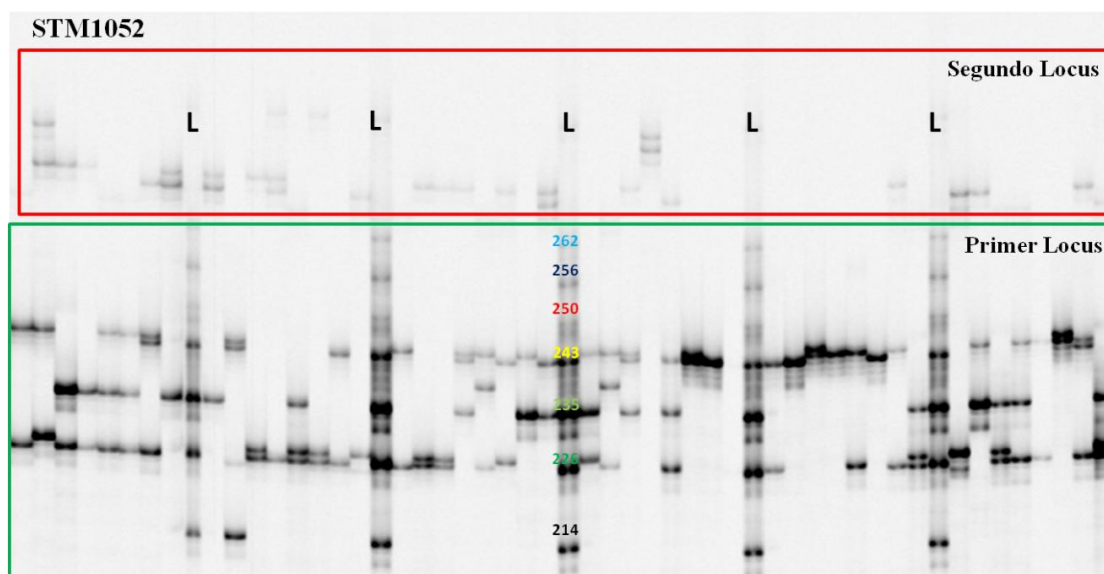


Figura 7. Patrón de bandas obtenido con el microsatélite STM1052 en el sistema LI-COR 4300. Los *ladders* "L" de tamaño estándar se posicionan cada 8 muestras. Se pueden apreciar dos loci diferenciados, siendo el segundo locus difuso por encima del locus principal.

Tabla 12. Número, tamaño y frecuencia de los alelos amplificados por cada microsatélite

Microsatélite	Tamaño en pares de bases (pb) y frecuencia de los alelos en la muestra total													
STI0033	131	137	140	143	149	152	155							
	0.645	0.047	0.031	0.090	0.113	0.070	0.004							
STI0003	148	149	157	158	167	170	173	176	179	188	208			
	0.002	0.045	0.002	0.327	0.132	0.292	0.026	0.059	0.080	0.026	0.009			
STI0032	127	130	133	135	136	138	139	141	142	145	148			
	0.018	0.013	0.038	0.023	0.307	0.028	0.145	0.030	0.294	0.096	0.008			
STI0030	104	106	107	108	109	112	115	118	121	125				
	0.057	0.235	0.087	0.105	0.227	0.048	0.048	0.142	0.009	0.044				
STM0031	185	195	196	197	203	205	211							
	0.327	0.036	0.039	0.027	0.440	0.083	0.048							
STM1053	180	183	186	187	189	190	192							
	0.006	0.008	0.259	0.008	0.430	0.275	0.014							
STI0001	194	197	200	203	206	209	212							
	0.344	0.366	0.024	0.051	0.030	0.022	0.164							
STI0014	136	138	139	142	143	145	148	151	154					
	0.003	0.038	0.165	0.038	0.017	0.368	0.351	0.014	0.006					
STG0001	136	139	141	142	144	146	148	149	150	151	152	154	157	161
	0.035	0.038	0.082	0.012	0.023	0.278	0.023	0.058	0.363	0.023	0.012	0.018	0.032	0.003
STI0004	83	92	95	98	101	107	112	118	121					
	0.013	0.027	0.562	0.054	0.097	0.017	0.117	0.080	0.033					
STM0037	89	91	93	95	97	99	101	105	107	109	133			
	0.081	0.427	0.125	0.006	0.020	0.049	0.032	0.087	0.142	0.009	0.020			
STG0016	137	143	148	151	154	157	160	172						
	0.010	0.236	0.034	0.163	0.377	0.062	0.027	0.091						
STM1106	145	157	160	163	166	169	172	175	178	181	190	211		
	0.062	0.194	0.099	0.017	0.011	0.206	0.110	0.194	0.073	0.023	0.003	0.008		
STM1064	201	206	207	208	209	211	213							
	0.004	0.709	0.013	0.055	0.135	0.063	0.021							
STI0012	183	186	188	189	191	192	201	204	207	210	234			
	0.058	0.079	0.037	0.323	0.024	0.005	0.050	0.307	0.098	0.003	0.016			
STM5114	299	302	305	308	310	311	314							
	0.032	0.026	0.211	0.363	0.003	0.005	0.361							
STM5121	300	301	303	306	307	309								
	0.401	0.076	0.224	0.194	0.026	0.079								
STG0010	176	177	180	181	182	184	185	187	192					
	0.017	0.371	0.103	0.003	0.417	0.071	0.006	0.009	0.003					
STG0025	211	214	215	219										
	0.015	0.221	0.622	0.142										
STM1104	183	186	187	189	190	192	193	195						
	0.082	0.302	0.008	0.135	0.095	0.019	0.167	0.193						
STPoAc58	245	247	248	249	251	253	255	256	259	261	263			
	0.160	0.020	0.133	0.405	0.054	0.014	0.020	0.167	0.003	0.007	0.017			
STM1052	214	225	226	227	235	239	243	244	245	256				
	0.008	0.008	0.258	0.086	0.144	0.008	0.181	0.272	0.011	0.022				
STM5127	248	254	255	257	258	263	266	269	276	285	288	291		
	0.009	0.028	0.052	0.052	0.113	0.222	0.045	0.090	0.028	0.189	0.170	0.002		

También se apreciaron microsatélites que aparentemente amplificaron loci sobrepuestos. De este modo el marcador STM5121 presentó alelos bien marcados y alelos tenues o difusos, lo que sucede en el total de la muestra. Al parecer hay una sobreposición de dos loci, el que presenta alelos claros y el que presenta alelos difusos (figura 8). Algo similar ocurre para el marcador STM1106, en donde los alelos comprendidos entre 145pb y 163 pb (parte inferior del locus) se muestran tenues. Al igual que en los casos anteriores y para evitar complicaciones se les consideró como un único locus.

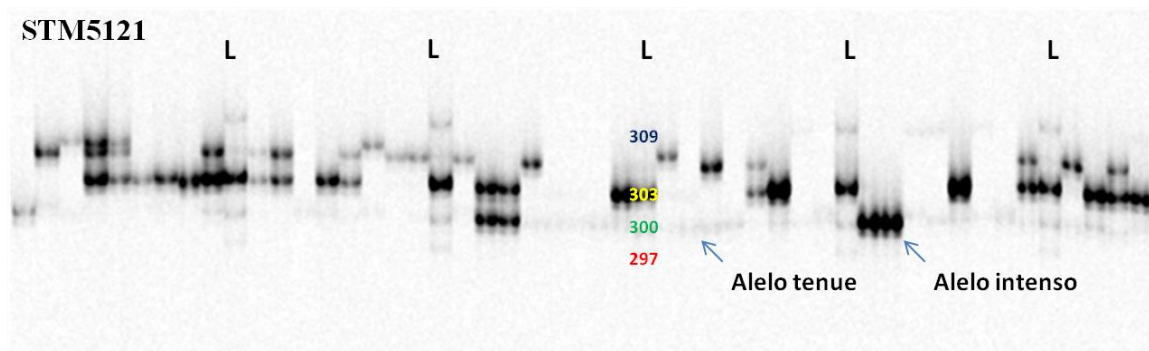


Figura 8. Patrón de bandas obtenido con el microsatélite STM5121 en el sistema LI-COR 4300. En la imagen se aprecian alelos tenues y alelos intensos, lo que posiblemente se deba a dos loci sobrepuestos para este microsatélite, uno principal que produce alelos intensos y el secundario que produce alelos tenues.

En general la amplificación de los 23 microsatélites resultó ser de buena calidad, salvo algunas excepciones: con el marcador STG0025 se presentaron manchas difusas a modo de frente de corrida; los loci de los marcadores STI0001, STI0014, STG0016 y STM5114 presentaron manchas tipo *smear* o barrido para sus bandas; y con el marcador STG0001 se presentaron bandas *stutters* para la mayoría de alelos de este locus. Estas manchas o *smear*, sin embargo, pueden desaparecer si se repiten las electroforesis, que por motivos económicos no se repite cuando estamos seguros que se pueden registrar sin complicación. En la figura 9 se aprecia una imagen representativa de la electroforesis de los productos de amplificación de un SSR (STI0030).

Se pudo notar que hubieron marcadores microsatélites de amplio rango de tamaño alélico, como el STM1106 y el STI0003 cuyos rangos fueron de 145 – 211 pb y de 148 – 208 pb, respectivamente. Mientras que los mínimos fueron para los marcadores STG0025 y STM5121, de 211 – 219 pb y 300 – 309 pb, respectivamente. Todos los demás marcadores tuvieron rangos de tamaño alélico intermedios.

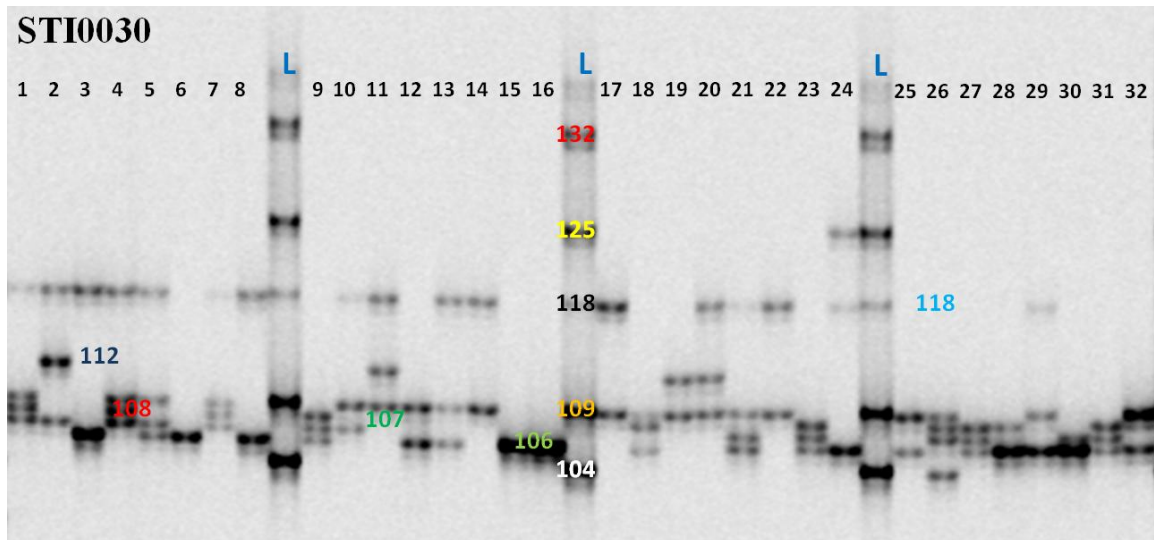


Figura 9. Patrón de bandas obtenido con el microsatélite STI0030 en el sistema LI-COR 4300. Se indican los tamaños, en pares de bases, de los alelos pertenecientes a las primeras 32 muestras (variedades de papas). Los *ladders* “L” de tamaño estándar se posicionan cada 8 muestras.

V.1.2. Alelos no reportados previamente

En un tercio de los microsatélites amplificados se encontraron alelos no reportados previamente en variedades de papas caracterizadas por el CIP. Los tamaños de estos alelos inéditos se listan en la tabla 13. El microsatélite STI0030 presentó el alelo nuevo de 208pb que además se encontró fuera del rango de tamaño alélico reportado previamente: 137 – 188 pb.

Además se pudo apreciar, en baja frecuencia, bandas extras o “artefactos” para ciertos microsatélites, cuyos tamaños superaban el rango de tamaño alélico reportado previamente para su locus, motivo por el cual no fueron tomados en cuenta como alelos verdaderos y quedaron fuera de los análisis (Tabla 14).

Tabla 13. Alelos inéditos amplificados por microsatélite

Microsatélite		Tamaño de los alelos (pb)		
CIP	SCRI			
S210	STI0003	148	208	
S225	STI0032	135	138	141
S216	STI0014	138	143	
S179	STG0001	141	161	
S214	STI0012	210		
S121	STM5121	301		
S029	STPoAc58	256	259	261
S084	STM1052	245		

Por otro lado, se encontró que los microsatélites STI0004 y STM1064 presentaron alelos de 95 pb y 206 pb, respectivamente, cuya presencia en la muestra total fue del 100%, es decir que se encontraban presentes en todas las variedades de papas analizadas en el presente trabajo y por tanto, podrían ser nominados alternativamente como alelos específicos del género.

Tabla 14. Variedades de papa que presentaron bandas tipo artefacto por microsatélite

Microsatélite		Rango de tamaño alélico (pb)	Variedad	Artefactos (pb)	
CIP	SCRI				
S179	STG0001	136 - 163	Sani Imilla, clon 30-3	214	
S101	STM1106	145 - 211	Yana Shiri, Azul Waña	231	
			Piñaza, Locka	234	
S029	STPoAc58	243 - 263	Walas, Runtush, Yana Tumbay, Wisculpa Atacan, Amarilla puka ñahui, Huayta vaso	279	
			Promesa, Yana Rayhuana, Unchunchaqui	281	
S084	STM1052	214 - 263	Quequerano	276	278

V.1.3. Alelos Nulos

En las amplificaciones se encontraron alelos nulos, es decir que no presentaron productos de amplificación detectables en ninguna de las repeticiones que se realizaron luego de no encontrar alelos en la primera amplificación. Éstos se encontraron presentes en los marcadores STPoAc58 y STM1052, siendo el locus del marcador STPoAc58 la región más proclive para este fenómeno, puesto que 7

variedades de 168, todas de Junín, presentaron ese tipo de alelos. Mientras que solo se encontró una variedad de la especie *S. goniocalix* que poseía un alelo nulo para el marcador STM1052, como se aprecia en la Tabla 15.

Tabla 15. Variedades con presencia de alelos nulos por microsatélite

SSRs con alelos nulos		Variedad
CIP	SCRI	
S029	STPoAc58	Muru camotillo, Camotillo rojo (gordo), Chilis runtus, Camotillo rojo y Caramelo
S084	STM1052	Quequerano

V.1.4. Relación entre motivos repetidos y tamaño de alelos

Se entiende por serie alélica a una secuencia de alelos que difieren en tamaño (pb) debido a un número menor o mayor del motivo repetitivo. En este sentido, se encontraron microsatélites con una sola serie alélica (STI0033, STM0037 y STM1106), con dos series alélicas (la mayoría de los microsatélites) y tres series alélicas (STI0030 y STI0014), como se detalla en la tabla 16.

V.1.5. Variedades que exceden la ploidía esperada

De acuerdo a la caracterización morfológica realizada por el personal del CIP de Huancayo se determinó la especie de la mayoría de variedades analizadas en el presente estudio. Asimismo, mediante la técnica de citometría de flujo (realizada previamente en el CIP) se determinó la ploidía de una parte del total de variedades de papas (ver anexo II).

Se encontró que cinco variedades de papa, en su mayoría de la especie *S. goniocalix*, excedían la ploidía esperada para dos o más microsatélites (Tabla 17). Nótese que la ploidía de la especie asignada por caracteres morfológicos (Huamán, 1986) no siempre concuerda con ploidía según la citometría de flujo, por lo que al final del nombre de la especie se le añadió un signo de interrogación (?).

Tabla 16. Series alélicas de motivos repetidos por marcador SSR

Microsatélite	motivo repetido	Número y tamaño (pb) de los alelos														
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
1	STI0033	(AGG) _n	131	137	140	143	149	152	155							
2	STI0003	(ACC) _n	148	149	157	158	167	170	173	176	179	188	208			
3	STI0032	(GGA) _n	127	130	133	135	136	138	139	141	142	145	148			
4	STI0030	(ATT) _n	104	106	107	108	109	112	115	118	121	125				
5	STM0031	(AC) _n ...(AC) _n GCAC (AC) _n (GCAC) _n	185	195	196	197	203	205	211							
6	STM1053	(TA) _n (ATC) _n	180	183	186	187	189	190	192							
7	STI0001	(AAT) _n	194	197	200	203	206	209	212							
8	STI0014	(TGG) _n (AGG) _n	136	138	139	142	143	145	148	151	154					
9	STG0001	(CT) _n	136	139	141	142	144	146	148	149	150	151	152	154	157	161
10	STI0004	(AAG) _n	83	92	95	98	101	107	112	118	121					
11	STM0037	(TC) _n (AC) _n AA (AC) _n (AT) _n	89	91	93	95	97	99	101	105	107	109	133			
12	STG0016	(AGA) _n	137	143	148	151	154	157	160	172						
13	STM1106	(ATT) _n	145	157	160	163	166	169	172	175	178	181	190	211		
14	STM1064	(TA) _n (TG) _n GT(TG) _n	201	206	207	208	209	211	213							
15	STI0012	(ATT) _n	183	186	188	189	191	192	201	204	207	210	234			
16	STM5114	(ACC) _n	299	302	305	308	310	311	314							
17	STM5121	(TGT) _n	300	301	303	306	307	309								
18	STG0010	(TG) _n	176	177	180	181	182	184	185	187	192					
19	STG0025	(AAAC) _n	211	214	215	219										
20	STM1104	(TCT) _n	183	186	187	189	190	192	193	195						
21	STPoAc58	(TA) _n	245	247	248	249	251	253	255	256	259	261	263			
22	STM1052	(AT) _n GT(AT) _n (GT) _n	214	225	226	227	235	239	243	244	245	256				
23	STM5127	(TCT) _n	248	254	255	257	258	263	266	269	276	285	288	291		



serie 1  serie 2  serie 3 

Tabla 17. Variedades que exceden la ploidia esperada según la caracterización con microsatélites

Nombre de la variedad de papa	especie asignada según datos morfológicos	Nº de alelos distintos por Microsatélite																		Ploidia esperada según los datos de citometría	Ploidia observada según la caracterización con SSR					
		STI0033	STI0003	STI0032	STI0030	STM0031	STM1053	STI0001	STI0014	STG0001	STI0004	STM0037	STG0016	STM1106	STM1064	STI0012	STM5114	STM5121	STG0010			STG0025	STM1104	STPoAc58	STM1052	STM5127
Yana Shiri	Cur (?)	2	5	3	2	2	3	3	3	2	3	2	4	1	3	3	4	3	2	2	3	3	2	5	4x	5x
Imilla Negra	Adg (?)	1	3	3	3	2	3	3	2	1	2	2	4	2	1	3	2	2	3	2	3	2	3	4	2x	4x
Suito Paceña	Gon	1	3	3	4	2	3	2	1	2	1	2	2	2	1	3	2	2	3	1	2	3	2	3	2x	4x
Puca Putis	Stn	2	2	2	3	3	3	2	4	2	2	2	2	1	1	1	3	2	2	1	2	2	3	2	2x	4x
Puca camotillo (A)	Gon	1	3	3	3	2	2	2	3	1	1	3	4	3	1	2	2	2	2	2	3	2	4	3	2x	4x

V.1.6. Variedades duplicadas según la caracterización con SSR

Del total de variedades analizadas en el presente estudio se pudo identificar 153 haplotipos mediante el programa Arlequín 3.1 en base a los patrones de alelos generados por los 23 SSR.

La mayoría de las 168 variedades de papa poseían un haplotipo único, sin embargo existieron variedades que compartían su haplotipo con una o dos variedades distintas, es decir eran individuos idénticos según la caracterización molecular. En la tabla 18 se listan las variedades con su lugar de procedencia que tienen haplotipos en común con otras variedades.

V.2. Análisis de la diversidad genética

V.2.1. Riqueza alélica

Dentro de las 168 variedades de papas analizadas en este estudio se encontró un total de 208 alelos distintos amplificados con los 23 SSR, siendo el promedio de 9,04 alelos por locus (diversidad alélica).

V.2.1.1. Riqueza alélica por región geográfica

Para los fines de este análisis se decidió agrupar a las papas provenientes de distintas localidades o departamentos en tres regiones: Norte, Centro y Sur. El agrupamiento se realizó de la siguiente manera:

- Norte: Cajamarca y Lambayeque. Con un total de 13 muestras.
- Centro: Huancavelica, Huánuco, Junín y Quilcas (Junín). Con un total de 72 muestras.
- Sur: Paucartambo (Cuzco I), Anta (Cusco II), Illpa (Puno). Con un total de 75 muestras.

Tabla 18. Variedades de papa que presentan haplotipos en común

Código de laboratorio	Variedad	Procedencia	Ploidia por citometría	Haplotipo
box2Bn157	Maco	Quilcas	4x	"142"
box2Bn164	Permata	Cusco II	4x	
box1A36	Imilla Negra	Puno Illpa	2x	"143"
box1A46	Maqtillu	Cusco I	4x	
box1A49	Puka Qompis	Cusco I	4x	
box1A39	Oqi Biruntos	Cusco I	4x	"144"
box1A40	Uqi Biruntos	Cusco I	4x	
box1B58	CICA	Cusco II	4x	"145"
box1B59	CICA	Cusco II	4x	
box1B60	Perricholi	Cusco II	4x	"146"
box1B61	Perricholi	Cusco II	4x	
box1B74	Janacaya	Cusco II	4x	"147"
box1B75	Suito Paceña	Cusco II	2x	
box1B76	Compis	Cusco II	4x	"148"
box1B87	Ccompis	Cusco II	4x	
box1B101	Yungay Rojo	Cajamarca	4x	"149"
box1B111	Yungay Llama	Lambayeque	4x	
box2An141	Cceccorani	CIP	2x	"150"
box2Bn170	Moro Orqo	Cusco II	2x	
box2An139	Cceccorani	Junín	?	
box2A123	Amarilla	Quilcas	2x	"151"
box2Bn163	Mashua papa	Junín	?	
box2A133	Añil	Cusco II	3x	"152"
box2A134	Sucollo	Cusco II	4x	
box2A135	Puca Putis	Cusco II	2x	
box2Bn165	Camotillo rojo	Junín	?	"153"
box2An140	Muru camotillo	Junín	?	

De este análisis resultó que la región del Sur fue la que presentó la mayor riqueza alélica, con 197 de los 208 alelos de la muestra total y con un promedio de 8.57 alelos por loci, como se muestra en la tabla 19. Las frecuencias alélicas por región se detallan en el anexo IV.

Como se recordara en este agrupamiento solo se trabajó con 160 de las 168 variedades, no considerándose a las variedades cultivadas en el CIP ya que no provenían de una localidad o departamento en particular.

Tabla 19. Riqueza alélica en papas por región geográfica de procedencia

Marcador SSR	Total de alelos	Número de alelos			
		Sur	Centro	Norte	
1	STI0033	7	6	6	6
2	STI0003	11	9	9	8
3	STI0032	11	11	10	7
4	STI0030	10	10	8	8
5	STM0031	7	7	7	5
6	STM1053	7	7	5	3
7	STI0001	7	7	5	6
8	STI0014	9	7	8	5
9	STG0001	14	14	10	8
10	STI0004	9	9	9	5
11	STM0037	11	11	8	6
12	STG0016	8	8	8	4
13	STM1106	12	12	9	5
14	STM1064	7	7	4	4
15	STI0012	11	10	8	7
16	STM5114	7	6	6	4
17	STM5121	6	6	5	5
18	STG0010	9	7	6	5
19	STG0025	4	4	4	3
20	STM1104	8	8	8	5
21	STPoAc58	11	10	8	3
22	STM1052	10	10	7	7
23	STM5127	12	11	11	7
Total		208	197	169	126
Promedio		9.04	8.57	7.35	5.48

V.2.1.2. Riqueza alélica de las variedades nativas y mejoradas

En este caso se nominaron a las diferentes variedades de papas bien como nativas, si es que habían sido conservadas a lo largo del tiempo por las comunidades campesinas locales por sus características particulares; o bien como mejoradas, si es que habían sido producto de un programa de mejoramiento genético convencional (mediante cruces de diferentes variedades) con el fin de obtener variedades más resistentes a enfermedades o de mayor valor agronómico, siendo denominadas como *S. tuberosum* (mejoradas).

En este sentido, se agruparon al total de las papas en dos grupos: el de las variedades nativas con 140 muestras y el de las variedades mejoradas con 28 muestras.

De este análisis se pudo observar que el grupo de las variedades nativas fue el que presentó mayor cantidad de alelos en comparación con las variedades mejoradas, lo cual resultó en un mayor promedio de alelos por locus de las nativas sobre las mejoradas (tabla 20). Asimismo, se evidenció una marcada variación en las frecuencias alélicas para ciertos microsatélites entre estos dos grupos (anexo IV).

Tabla 20. Comparación de la Riqueza alélica entre variedades mejoradas y nativas

Marcador SSR	Total de alelos	Número de alelos	
		Nativas	Mejoradas
1	STI0033	7	6
2	STI0003	11	10
3	STI0032	11	7
4	STI0030	10	8
5	STM0031	7	6
6	STM1053	7	3
7	STI0001	7	6
8	STI0014	9	5
9	STG0001	14	9
10	STI0004	9	8
11	STM0037	11	7
12	STG0016	8	7
13	STM1106	12	7
14	STM1064	7	6
15	STI0012	11	7
16	STM5114	7	5
17	STM5121	6	6
18	STG0010	9	6
19	STG0025	4	3
20	STM1104	8	7
21	STPoAc58	11	5
22	STM1052	10	6
23	STM5127	12	8
Total		208	148
Promedio		9.04	6.43

V.2.2. Alelos comunes y exclusivos

V.2.2.1. Alelos comunes y exclusivos de cada región

De los 208 alelos caracterizados, se presentaron en total 106 alelos comunes o compartidos por las tres regiones de colecta. Todos los marcadores presentaron alelos comunes, siendo 6 el número máximo y 3 el número mínimo de alelos compartidos por marcador.

También se registraron alelos exclusivos, es decir aquellos que solo estaban presentes en una de las 3 regiones nominadas. Dichos alelos estuvieron presentes para cada región, siendo la región Sur la que presentó el mayor número de éstos, es decir 19 alelos exclusivos, seguido por la región Centro con 9 y por último la región Norte con solo 2. En 8 de los marcadores analizados no se evidenció la presencia de alelos exclusivos. Estos datos se detallan en la siguiente tabla.

Tabla 21. Alelos comunes y exclusivos por SSR para las regiones geográficas

Marcador SSR		Alelos comunes por las 3 regiones	Número de alelos exclusivos		
			Sur	Centro	Norte
1	STI0033	5	0	1	0
2	STI0003	6	0	0	2
3	STI0032	6	0	0	0
4	STI0030	6	0	0	0
5	STM0031	5	0	0	0
6	STM1053	3	2	0	0
7	STI0001	4	0	0	0
8	STI0014	4	0	2	0
9	STG0001	5	1	0	0
10	STI0004	5	0	0	0
11	STM0037	4	1	0	0
12	STG0016	4	0	0	0
13	STM1106	5	3	0	0
14	STM1064	3	2	0	0
15	STI0012	6	2	1	0
16	STM5114	4	1	1	0
17	STM5121	5	1	0	0
18	STG0010	3	1	2	0
19	STG0025	3	0	0	0
20	STM1104	5	0	0	0
21	STPoAc58	3	3	1	0
22	STM1052	6	2	0	0
23	STM5127	6	0	1	0
Total		106	19	9	2

V.2.2.2. Alelos comunes y exclusivos de las variedades nativas y mejoradas

Para este caso de los 208 alelos caracterizados, se presentaron en total 143 alelos comunes entre las variedades de papas nativas y mejoradas. Todos los marcadores presentaron alelos comunes, siendo el marcador STG0001 el que presentó mayor número de éstos, es decir 9 alelos compartidos.

Del mismo modo se registraron alelos exclusivos, en este caso eran aquellos que solo estaban presentes bien en las variedades nativas o bien en las variedades mejoradas (Tabla 22). Casi todos los marcadores presentaron alelos exclusivos a excepción del marcador STM5121. Las papas nativas presentaron mayor número de alelos exclusivos con respecto a las papas mejoradas.

V.2.3. Heterocigocidad esperada

La heterocigocidad esperada (H_e) de la muestra total fue calculada para cada microsatélite en base a la caracterización de las 168 variedades de papas. El valor más elevado fue obtenido por el iniciador STM5127 (0.86) y el menor por el STM1064 (0.47). El valor promedio de H_e para los 23 marcadores microsatélites analizados fue de 0.73 (ver anexo V).

Tabla 22. Alelos comunes y exclusivos por SSR entre las variedades nativas y mejoradas de papa

Marcador SSR	Alelos comunes	Número de alelos exclusivos		
		Nativas	Mejoradas	
1	STI0033	6	1	0
2	STI0003	8	1	2
3	STI0032	6	4	1
4	STI0030	8	2	0
5	STM0031	6	1	0
6	STM1053	3	4	0
7	STI0001	6	1	0
8	STI0014	5	4	0
9	STG0001	9	5	0
10	STI0004	8	1	0
11	STM0037	7	4	0
12	STG0016	7	1	0
13	STM1106	7	5	0
14	STM1064	6	1	0
15	STI0012	7	4	0
16	STM5114	5	2	0
17	STM5121	6	0	0
18	STG0010	4	3	2
19	STG0025	3	1	0
20	STM1104	7	1	0
21	STPoAc58	5	6	0
22	STM1052	6	4	0
23	STM5127	8	4	0
Total		143	60	5

V.2.3.1 Heterocigosidad esperada por regiones

La He también fue calculada para cada una de las regiones de colecta, donde se apreció que aparentemente la región Norte fue la que poseía la mayor He promedio (0.78), seguida de la región Sur (0.76) y finalmente la región Centro (0.67).

En general las Heterocigosidades en las tres regiones resultaron ser similares (ver anexo V), a excepción de la He del marcador STI0033 para la región Centro que tuvo un valor extremadamente bajo (0.15) en comparación a los demás (Figura 10).

V.2.3.2. Heterocigosidad esperada por variedades nativas y mejoradas

De manera análoga calculamos la He para el grupo de variedades nativas (140) y de las mejoradas (28).

El grupo de las variedades mejoradas presentó una He promedio aparentemente más alta (0.76) que las variedades nativas (0.71).

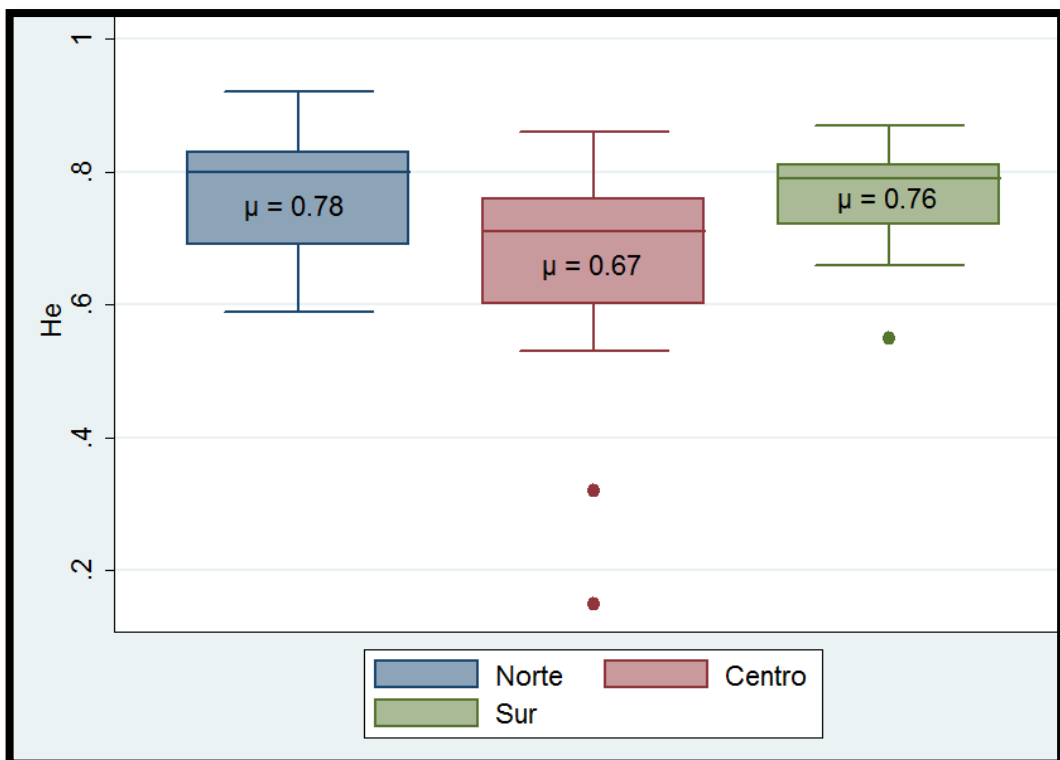


Figura 10. Distribución y promedio de las Heterocigosidades de las regiones

En general se apreciaron que las He eran altas tanto para las variedades nativas como para las mejoradas (ver anexo V), sin embargo con los marcadores STI0033 y STM1064 se presentó valores extremadamente bajos de He para las variedades nativas (0.38 y 0.37, respectivamente) como se aprecia en la figura 11.

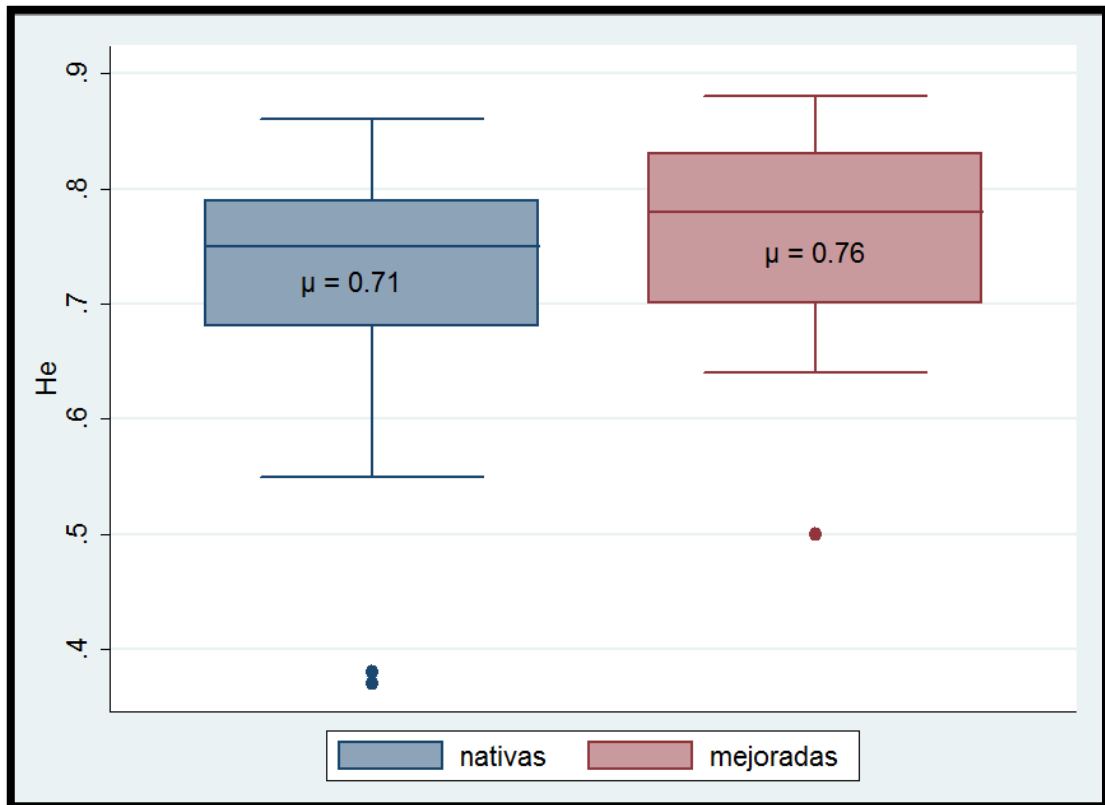


Figura 11. Distribución y promedio de las Heterocigosidades según el tipo de variedad

V.3. Análisis de la Varianza Molecular

V.3.1. Agrupando por regiones: Norte, Centro y Sur

Se agruparon a las papas provenientes de diferentes localidades (tal como se hizo en los análisis anteriores) por su ubicación geográfica en tres regiones:

- Norte: Cajamarca y Lambayeque.
- Centro: Huancavelica, Huánuco, Junín y Quilcas (Junín).
- Sur: Paucartambo (Cuzco I), Anta (Cusco II), Puno IIIpa.

Al realizar el AMOVA de estos 3 grupos obtuvimos que el 89,47% de la variación genética es debido a diferencias dentro de las localidades, mientras que el 8,17% y 2,36% se dan por diferencias entre regiones y entre localidades dentro de las Regiones, respectivamente, resultados que se muestran en la tabla 23.

Con el objetivo de determinar entre qué regiones se daba la mayor diferenciación genética, hicimos una modificación en el agrupamiento, para esto tomamos de a pares a las regiones (Norte – Sur, Norte – Centro y Centro – Sur) y las comparamos mediante el AMOVA (ver anexo VII). Según estos resultados se aprecia que la mayor variación genética se da entre las regiones Norte – Centro (20.77%), seguida del par Norte – Sur (7.30%) y con menos diferenciación el par Centro – Sur (5.90%). En los tres casos se apreció que la variación genética entre las poblaciones dentro de dichas regiones fue mínima.

Tabla 23. Análisis de Varianza Molecular de las variedades de papas según su región de procedencia

Fuente de Variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados (SC)	Componentes de Varianza	Porcentaje de Variación
Entre Regiones	2	233.96	1.90 Va	8.17
Entre Localidades dentro de las Regiones	6	179.59	0.55 Vb	2.36
Entre Individuos dentro de las Localidades	151	3134.70	20.76 Vc	89.47
Total	159	3548.25	23.20	100

V.3.2. Agrupando por variedades nativas y mejoradas

Para realizar este AMOVA se consideraron dos grupos:

1. Variedades nativas con 140 muestras; y
2. Variedades mejoradas con solo 28 muestras.

Los resultados del Análisis de Varianza Molecular (tabla 24) indican que el mayor porcentaje de variación genética se da dentro de los grupos propuestos que entre ellos, siendo éstos de 82,34% y 17,66%, respectivamente.

Tabla 24. Análisis de Varianza Molecular entre las variedades de papas nativas y mejoradas

Fuente de Variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados (SC)	Componentes de Varianza	Porcentaje de Variación
Entre Variedades Nativas y Mejoradas	1	229.65	4.47 Va	17.66
Dentro de las Variedades	166	3463.16	20.86 Vb	82.34
Total	167	3692.81	25.34	100

V.4. Análisis de agrupamiento

El análisis de agrupamiento de las 168 variedades de papas se realizó utilizando el programa Darwin 5.0. Según la matriz de disimilitud, calculada a partir del coeficiente de Jaccard, el índice de disimilitud promedio entre las variedades muestreadas fue de 0.625, el valor mínimo fue de 0 (variedades duplicadas) y el máximo de 0.856, entre CICA (mejorada) y Locka (*S. juzceksuki*), estos resultados se muestran en el anexo VI.

Según la topología del dendrograma (Figura 12) resultante se pudieron distinguir claramente 112 ramas bien diferenciadas (Índice de disimilitud > 0.2), a las que designamos como “morfotipos” (de Haan *et al.*, 2010), y 153 haplotipos únicos (bordes al final de cada rama), la mayoría de cuales tenía una probabilidad de ocurrencia superior al 50 % según el análisis *Bootstrap*.

El dendrograma resultante se coloreó siguiendo tres criterios de análisis: en base a su identidad taxonómica, en base a su región geográfica de procedencia y en base al tipo de variedad (nativa o mejorada).

V.4.1. Dendrograma por identidad taxonómica y ploidia

Se pudo apreciar en la topología del árbol (Figura 12) que las variedades de papas tienden a agruparse según el grupo taxonómico al que pertenecen, siendo las especies *S. tuberosum subsp. andigena* y *S. tuberosum* (mejorada) las que mejor se agrupan como en la parte superior del dendrograma, a excepción de las variedades andígenas: “Oqi Biruntos”, “Uqi Biruntos” y “kuchillo Paki” que se ubicaron distantes y más cerca del grupo de las papas diploides. *S. goniocalix* se encuentra formando un grupo definido en la parte inferior de la misma figura, salvo algunas variedades como “Suito Paceña” y “Puca camotillo (A)” que se alejan de este grupo.

En el caso de *S. curtilobum* y *S. juzceksuki* definen un pequeño grupo que se diferencia claramente del resto, a pesar de poseer tan solo 4 entradas. La única entrada de *S. phureja* se encuentra dentro del grupo de *S. goniocalix*.

Por otro lado, *S. Stenotomun* se encuentra agrupada en la parte inferior muy cerca de *S. goniocalix*. Sin embargo hay 2 entradas que caen más cerca al grupo de *S. tuberosum subsp. andigena*. Éstas fueron la variedad “Puca Putis” y “Puccya”, esta última cae casi en el borde entre las variedades diploides y tetraploides. En el caso de *S. chaucha* esta no se encuentra formando un grupo bien estructurado, más bien su distribución es amplia en la parte inferior del dendrograma.

El *bootstrap* mostró valores superiores al 50% de probabilidad, por lo general para las ramas terminales del dendrograma, solo en el caso del nodo inicial de *S. curtilobum* y *S. juzceksuki* se mostró un valor de *bootstrap* alto (98% de probabilidad) que respalda a este clado.

Si se analizan a las variedades de papas por su ploidia también se aprecia cierto agrupamiento, así en la parte superior del dendrograma se encuentran distribuidas las especies tetraploides (*S. tuberosum subsp. andigena* y *S. tuberosum* (mejorada)), mientras que en la parte inferior derecha se encuentran básicamente las especies

diploides (*S. phureja*, *S. goniocalix*, *S. stenotomun*). Las especies híbridas (*S. curtilobum*, *S. juzsezkuki*) se encuentran en el extremo inferior izquierdo. Por su lado, la especie triploide *S. chaucha* forma un grupo poco diferenciado.

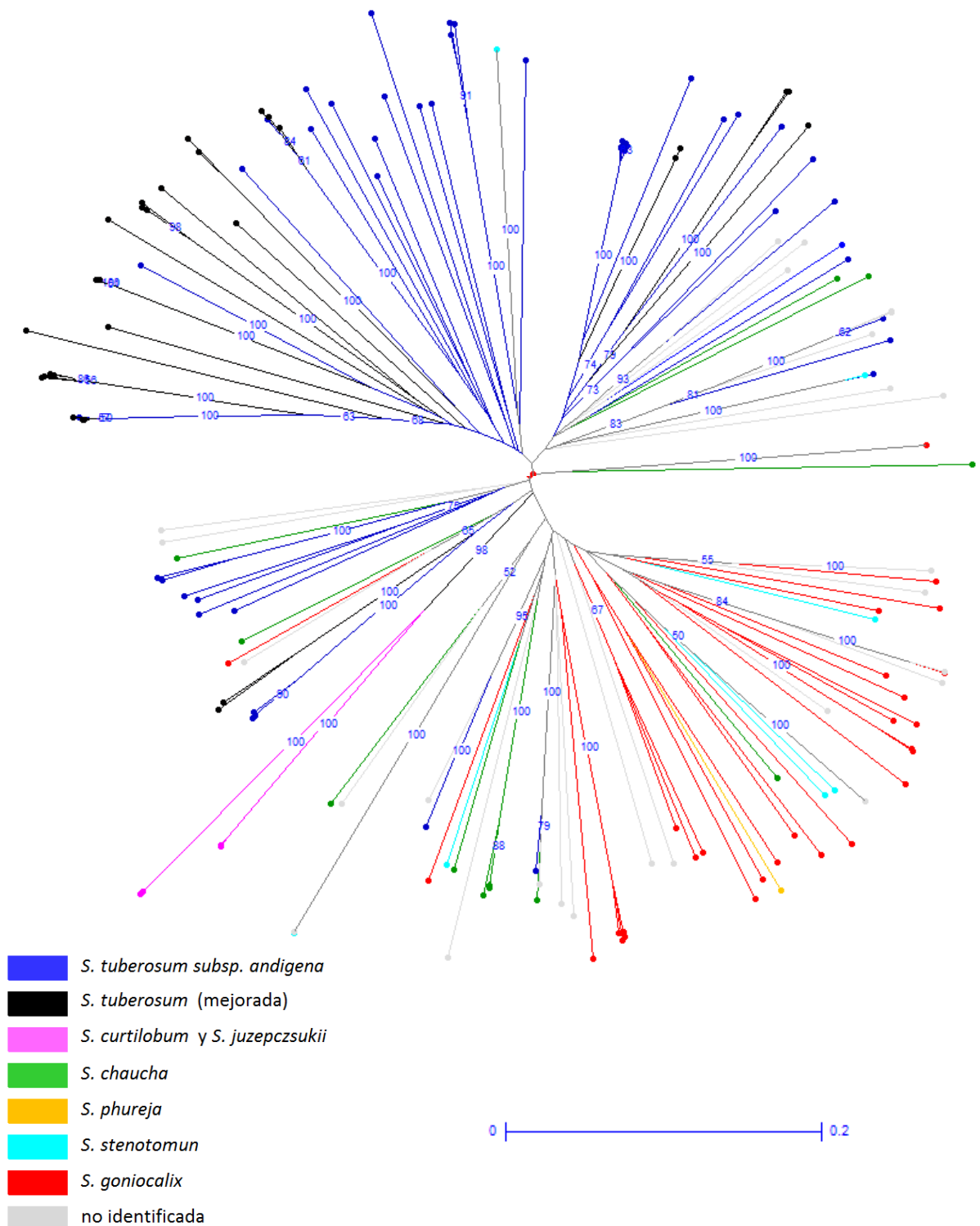


Figura 12. Dendrograma de las variedades de papas cultivadas según su identidad taxonómica. La barra inferior es una representación a escala de la distancia genética.

V.4.2. Dendrograma por regiones geográficas: Norte, Centro y Sur

En este caso se distinguieron a las variedades de papas según la región geográfica a la que pertenecían. Se calculó la disimilitud promedio entre las variedades dentro de cada región. La región Norte tuvo una disimilitud promedio de 0.558, la región Centro una disimilitud de 0.585 y la región Sur de 0.618 (ver Anexo VI).

En el dendrograma se apreció una tendencia de agrupación según la región a la que pertenecían las papas (Figura 13), así las provenientes del Centro (que básicamente eran diploides) se agruparon en la parte inferior izquierda del dendrograma y las del Sur (en su mayoría tetraploides nativas) en la parte superior; en cambio las del Norte (tetraploides mejoradas) no se agruparon definitivamente en alguna región del dendrograma.

V.4.3. Dendrograma por variedades nativas y mejoradas

Al igual que los análisis anteriores a las 168 variedades de papas se les subdividió en dos grupos: variedades nativas y variedades mejoradas.

La disimilitud dentro del grupo de las variedades nativas resultó ser de 0.610, mientras que para las mejoradas fue de 0.556.

En el dendrograma (figura 14) se apreció que la mayoría de variedades mejoradas se agrupaban en un extremo de éste, salvo ciertas entradas que se sobrelapaban con el grupo de las nativas como “Liberteña” y “CICA”. En el caso de las nativas su distribución fue mayor y solamente 3 variedades se sobreponen en el grupo de las variedades mejoradas. Dichas muestras correspondieron a las variedades “Permata”, “Maco” y “Shoga Colorada”, todas ellas variedades pertenecientes al grupo taxonómico de *S. tuberosum* subsp. *andigena*.

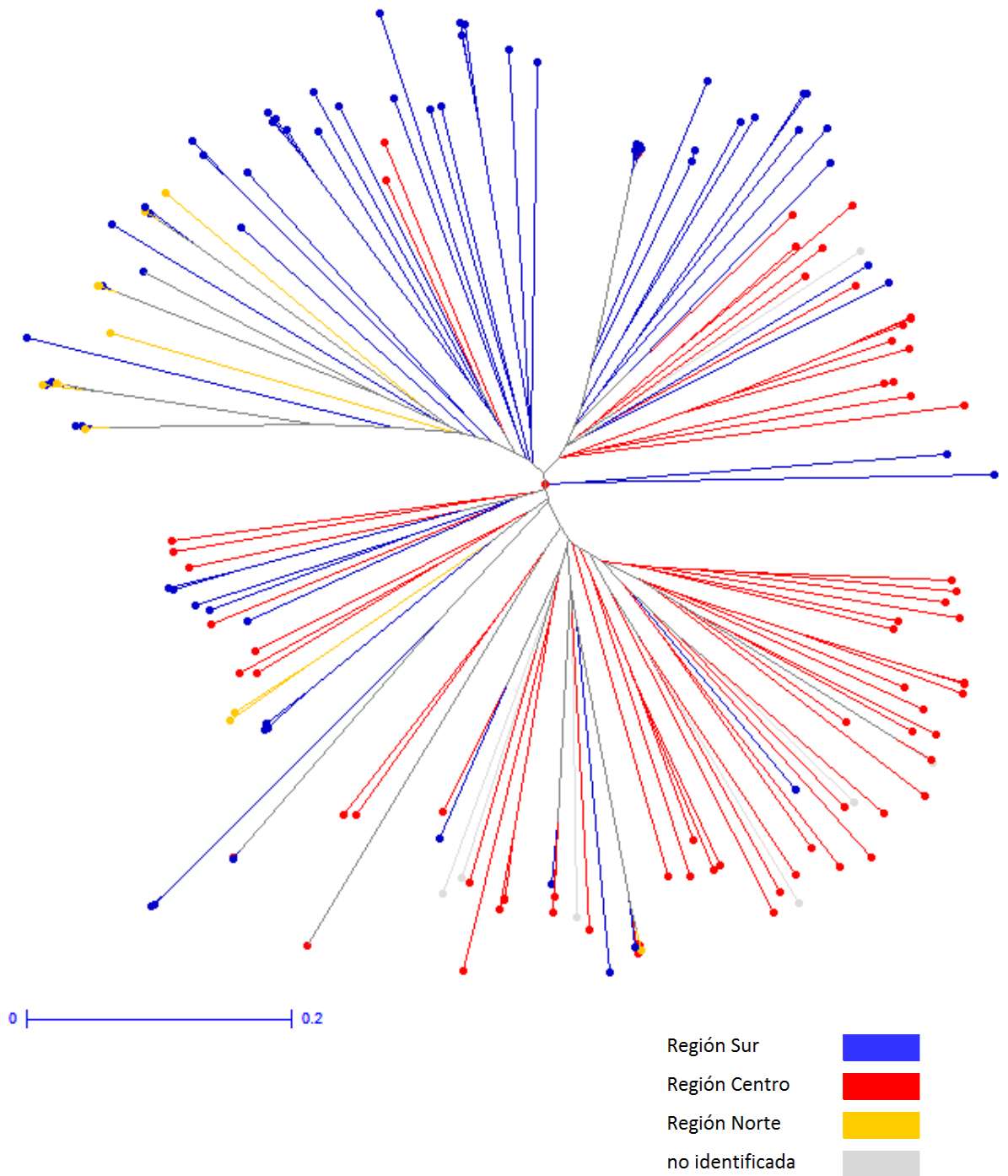


Figura 13. Dendrograma de las variedades de papas cultivadas según su región de procedencia. La barra inferior es una representación a escala de la distancia genética.



Figura 14. Dendrograma de las variedades de papas nativas y mejoradas cultivadas en el Perú. La flecha roja indica el clado principal de las variedades mejoradas ($2n = 4x$). Las variedades mejoradas CICA, Liberteña y Liberteña Cutervo se ubican fuera del clado principal de las variedades mejoradas.

V.5. Análisis estadístico de datos

Con el objetivo de comparar las medias de las heterocigidades poblacionales por regiones y por categoría (nativa o mejorada) se realizaron las pruebas estadísticas correspondientes para determinar si existían diferencias significativas entre éstas.

V.5.1. Análisis por regiones

Medias de las Heterocigidades

En la tabla 25 se describen las medias de las heterocigidades y en la figura 10 se representa la distribución de las heterocigidades por regiones.

Tabla 25. Medias de las Heterocigidades por regiones

Región	Numero de He	Media	Desviación Estándar	Mínimo	Máximo
Norte	23	0.78	0.09	0.59	0.92
Centro	23	0.67	0.16	0.15	0.86
Sur	23	0.76	0.09	0.55	0.87

Pruebas de Normalidad para las Heterocigidades

Se realizó la prueba de Shapiro Wilk para evaluar la normalidad de las heterocigidades de cada región. Se determinó que solo las heterocigidades de la región Norte presentaban una distribución normal, por lo que fue necesaria una transformación cúbica (3) de las variables (He) para normalizar a las heterocigidades de todas las regiones.

Análisis de Varianza (ANOVA) de las He medias

Se realizó un análisis de varianza para contrastar si existen diferencias entre las medias de las heterocigidades cúbicas transformadas recientemente (He^3). Para este fin planteamos las siguientes hipótesis:

$$H_0: \mu_n = \mu_c = \mu_s$$

$$H_a: \text{al menos dos } \mu \text{ difieren}$$

Donde:

$$\mu_n = He^3 \text{ media del Norte}$$

$$\mu_c = He^3 \text{ media del Centro}$$

$$\mu_s = He^3 \text{ media del Sur}$$

Trabajamos con una significancia: $\alpha = 0.05$.

Tabla 26. ANOVA (A) y comparación de He³ medias (B) entre regiones

A. Análisis de Varianza (ANOVA)					
Categoría	Suma de cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrados Medios	F	Prob > F
Entre Grupos	0.26	2	0.13	5.87	0.005
Dentro de Grupos	1.47	66	0.02		
Total	1.73	68	0.03		
Test de Barlett para igualdad de varianzas: chi2 (2) = 0.72 Prob > chi2 = 0.70					
B. Comparación de He³ medias entre regiones (Prueba de Bonferroni)					
	Norte	Centro			
Centro	- 0.144				
	0.005				
Sur	-0.033	0.111			
	1.000	0.042			

En la tabla 26 se determinó por la prueba de Barlett que las varianzas son homogéneas ($P = 0.70$). En la tabla de ANOVA observamos que el valor F es de 5.87 con un $P = 0.005$ que es menor a " α ", por lo tanto se rechaza la H_0 . Es decir que existen diferencias entre por lo menos un par de He³ medias. Luego se hizo una prueba *a posteriori* de Bonferroni y se determinó que existían diferencias significativas entre las He³ medias de la regiones Centro y Norte ($P = 0.005$) y, Centro y Sur ($P = 0.042$).

V.5.2. Análisis por variedades nativas y mejoradas

Medias de las Heterocigosidades

En la tabla 27 se describen las heterocigosidades medias, mientras que la figura 11 representa la distribución de las heterocigosidades por tipo de variedad.

Tabla 27. Medias de las Heterocigosidades según el tipo de variedad

Tipo	Heterocigosidades	Media	Desviación Estándar	Mínimo	Máximo
Nativas	23	0.71	0.13	0.37	0.86
Mejoradas	23	0.76	0.09	0.50	0.88

Pruebas de Normalidad para las Heterocigocidades

Se realizó la prueba de Shapiro Wilk para evaluar la normalidad de las Heterocigocidades. Sin embargo, las Heterocigocidades de las variedades nativas y mejoradas no poseían distribución normal, por lo que fue necesario una transformación cúbica de éstas (He^3).

Prueba de Hipótesis para las He promedio

Al cumplirse los supuestos de distribución normal e igualdad de varianzas de las He^3 se realizó una prueba de hipótesis para evaluar si existen diferencias entre las He^3 medias de las papas nativas y mejoradas. Se plantearon las siguientes hipótesis:

$$H_o: \mu_n = \mu_m / \mu_n - \mu_m = 0$$

$$H_a: \mu_n \neq \mu_m / \mu_n - \mu_m \neq 0$$

Donde:

μ_n = He^3 media de las variedades nativas

μ_m = He^3 media de las variedades mejoradas

Trabajamos con una significancia: $\alpha = 0.05$.

Tabla 28. Prueba de hipótesis entre las He^3 medias de nativas y mejoradas

Prueba de Hipótesis T entre las He^3 medias					
Papas	Total	He^3 media	Desviación estándar	[Intervalo de confianza al 95%]	
Nativas	23	0.38	0.16	0.32	0.45
Mejoradas	23	0.45	0.13	0.40	0.51
Diferencia		-0.07		-0.16	0.20
diferencia = He^3 media (nativas) - He^3 media (mejoradas)				t = -1.64	
H _o : diferencia = 0				Grados libertad = 44	
H _a : diferencia < 0		H _a : diferencia ≠ 0		H _a : diferencia > 0	
P (T < t) = 0.053		P (T > t) = 0.107		P (T > t) = 0.946	

En la Tabla 28 se aprecia que $P = 0.107$, que es mayor a la significancia “ α ” con la que estamos trabajando, por lo tanto no rechazamos la H_o y podemos afirmar que no existen evidencias significativas que indiquen diferencias entre las He^3 medias de las papas nativas y mejoradas.

VI. DISCUSIÓN

La caracterización molecular de la papa mediante marcadores microsatélites resulta de mucha importancia, ya que es un medio para determinar su diversidad genética, diferenciación genética interpoblacional y agrupamiento.

VI.1. Registro y caracterización de los 23 iniciadores microsatélites

Los marcadores microsatélites del PGI-Kit (Ghislain *et al.*, 2004) han sido reportados como polimórficos en una amplia gama de especies de papa tal como *S. stenotomum*, *S. goniocalix*, *S. phureja*, *S. ajanhuiri*, *S. juzepczsukii*, *S. curtilobum*, *S. chaucha* y *S. tuberosum* (Ames, 2003; Soto, 2006; de Haan *et al.*, 2010). En esta investigación se encontró que el número promedio de alelos por locus en la muestra fue alrededor de 9, comprobándose el alto nivel polimórfico de estos marcadores.

En el presente estudio se encontró que el marcador microsatélite STM1052 amplificó dos regiones polimórficas diferenciadas por un número significativo de pares de bases, por lo que se sospecha que sea polimórfico; no obstante falta su comprobación. Estos resultados ya habían sido reportados por Soto (2006), indicando bandas difusas sobre el locus principal. Posiblemente estos resultados se deban al fenómeno de duplicación génica que es frecuente en plantas como parte del mecanismo evolutivo de éstas. Tales duplicaciones pueden ocurrir en regiones codificantes o no, como intrones y regiones reguladoras o intergénicas (Flagel *et al.*, 2009). La duplicación génica a la vez se encuentra favorecida por procesos de poliploidización y entrecruzamiento o *crossing over* desigual durante la replicación y recombinación de DNA, así mismo los elementos génicos transponibles pueden también originarlos (Hurles, 2004). Su comprobación a través del secuenciamiento (determinación de la secuencia de nucleótidos) de estos alelos ayudaría a determinar si pertenecen al locus microsatélite, a un segundo locus o si son artefactos de amplificación.

Las manchas tipo *smear* que se presentaron para algunos microsatélites se pueden deber a que el DNA genómico (a partir del cual se realizó la amplificación) se encontraba parcialmente degradado o que las condiciones de amplificación no estaban del todo estandarizadas, por lo que estarían relacionadas con la electroforesis misma. Por otro lado las bandas tipo *stutters* (o tartamudeos) se deben a deslizamientos de la *taq* polimerasa a la hora de síntesis del DNA en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), produciéndose amplicones de diferente tamaño por la adición o sustracción de un motivo repetitivo (Butler, 2006). Este fenómeno es de mayor frecuencia cuando el motivo repetitivo del microsatélite es más pequeño, por ejemplo si el motivo repetitivo es un dinucleótido tendrá más probabilidad de producir bandas *stutters* que un tetranucleótido (Smith *et al.*, 1997). Este fenómeno se pudo notar en el microsatélite STG0001 cuyo motivo repetitivo es solo de dos nucleótidos (CT)_n.

Es probable que las variedades de papas nativas o mejoradas que no hayan sido caracterizados antes por este Kit de microsateclites produzcan alelos inéditos no reportados previamente tal y como se muestran en la tabla 12, siendo la mayoría producidos por los microsatélites STI0032 y STPoAc58 que son marcadores altamente polimórficos.

Los alelos ubicuos presentes en los marcadores STI0004 y STM1064 pueden ser considerados como alelos específicos del género *Solanum*, tal y como lo había reportado Feingold *et al.*, (2005) para un alelo del marcador STI040. Por esta razón la heterocigocidad en estos marcadores fue baja, siendo de 0.65 para STI0004 y de 0.47 para STM1064.

Los alelos nulos son producto de las mutaciones, inserciones o deleciones que ocurren en las regiones flanqueantes al motivo repetitivo o microsatélite, principalmente en la región de hibridación de un iniciador, y por lo tanto inhiben o anulan completa o parcialmente la unión de los iniciadores de dicho microsatélite,

resultando en la reducción o completa pérdida del producto de amplificación (Callen *et al.*, 1993). A estos alelos se les puede llamar también alelos fantasma ya que están presentes, solo que no es posible detectarlos. Además estos alelos suelen fijarse en las poblaciones y serían los responsables de los intentos fallidos de amplificación heteróloga (Chambers y MacAvoy, 2000). En nuestro estudio los microsatélites STPoAc58 y STM1052 presentaron alelos nulos, siendo el primero el que presentó mayor cantidad de éstos, lo que nos estaría indicando que el sitio de anclaje para al menos un iniciador de cada marcador no se encuentra conservado en todas las variedades de papas cultivadas del presente estudio.

Se pudieron observar más de una serie alélica en algunos SSR. En este sentido, las variaciones alélicas de los microsatélites no solo se deben a las diferencias del número de las unidades simples repetitivas sino que también pueden ocasionarse por interrupciones dentro del arreglo en tándem, tales como sustituciones nucleotídicas e inserciones/delecciones, o en las regiones flanqueantes del motivo repetitivo (Ames, 2003).

Cuando se compararon las ploidias determinadas previamente por citometría de flujo (ploidia esperada) con las ploidias determinadas por el patrón alélico de los SSR de cada variedad, se encontró que habían individuos que presentaban una ploidia menor a la esperada, lo cual es posible si las variedades presentan por lo menos un par de alelos homocigotos en cada microsatélite analizado y por la naturaleza dominante de los microsatélites cuando se analizan individuos poliploides. Si bien es cierto que cuando se analizan marcadores microsatélites se pueden detectar todos los alelos de un locus (naturaleza codominante), no es posible determinar el dosaje genético de los alelos en individuos poliploides con la metodología utilizada.

Por otro lado, se encontraron variedades que presentaron una ploidia mayor a la esperada, para lo cual se pueden sustentar algunas hipótesis de acuerdo a la variedad

involucrada: en el caso de “Yana Shiri” e “Imilla negra” estas presentaron una ploidia de $4x$ y $2x$, respectivamente (determinadas por citometría de flujo), que no concordaba con la de la especie que se le había asignado según sus datos morfológicos, sin embargo, la ploidia observada según el patrón alélico de los SSR si concordaba con la especie asignada, por lo que se presume que para estos casos hubo un error en la cuantificación de las ploidias por el método de citometría de flujo. Para el caso de “Suito Paceña” y “Puca Putis” la explicación más probable para este fenómeno es que dichas muestras se hayan contaminado con el material genético de las muestras adyacentes a éstas (pertenecientes a variedades tetraploides) en la placa de almacenaje que contenía el DNA de todas las muestras o se haya producido una mezcla durante la colección de hojas, ya que la ploidia determinada por citometría coincide con el de la especie asignada de acuerdo a los datos morfológicos. Para el caso de “Puca Camotillo (A)” puede tratarse de una variedad de *S. goniocalix* tetraploide, en la que además hubo un error en la cuantificación por citometría de flujo, ya que las muestras adyacentes eran diploides. Para este último caso la hipótesis se basa en el estudio de Ghislain *et al.* (2006) en *S. phureja* donde apreció que el 31% de una colección de dicha especie eran triploides o tetraploides, cuando supuestamente esta *S. phureja* es netamente diploide. Para estos tres últimos casos una explicación alternativa sería la de los loci duplicados, como lo reportó Lefort (1999) en una especie de árbol diploide donde la mitad de la población analizada presentó un patrón trialélico. Sin embargo este fenómeno se presentó para varios loci a la vez, por lo que es poco probable.

En la caracterización molecular con los 23 microsatélites se pudieron notar que la mayoría de las variedades tenían un haplotipo único y solo algunas compartían su haplotipo con una o dos variedades más. Estos haplotipos comunes se esperaban para las variedades de papas con nombre idéntico como por ejemplo las variedades “CICA” y “Perricholi”; o variedades con nombres casi idénticos como “Oqi Biruntos” y

“Uqi Biruntos”. En el caso de las variedades con distinto nombre y procedencia (Puno y Cuzco) cuyos haplotipos fueron iguales, como por ejemplo el caso de “Imilla Negra”, “Maqtillu” y Puka Qompis”, la razón sería que los agricultores de las diferentes comunidades campesinas muchas veces nominan con nombres distintos a un mismo tipo de papa, en base a las características morfológicas del tubérculo, que fenotípicamente puede variar dadas las condiciones climáticas del lugar (Gómez, 2000). Finalmente, para las variedades que presentaron este mismo fenómeno y que tenían códigos correlativamente seguidos, como es el caso de “Añil”, “Sucollo” y “Puca Putis”, lo más probable es que dicha repetición haplotípica se deba a una contaminación entre el material genético de las muestras.

VI.2. Análisis de la diversidad genética

VI.2.1. Riqueza alélica

Del total de las papas caracterizadas con estos microsátélites se logró detectar un total de 208 alelos distintos. Estudios previos, que utilizaron parte de estos SSR, han reportado también un número alto de alelos para diversas poblaciones: en colecciones núcleo de *S. phureja* (Andrade, 2001) y *S. tuberosum* (Ames, 2003); en poblaciones de papas cultivadas y silvestres (Merino, 2006); en poblaciones de papas nativas provenientes de 5 departamentos del Perú (Soto, 2006) y con poblaciones nativas de papas de Huancavelica (de Haan *et al.*, 2010).

La riqueza alélica presentada en cada región está influenciada por el número de muestra o variedades, es así que la región Norte al tener solo 13 muestras presentó la menor riqueza alélica, mientras que la región Sur al tener la mayor cantidad de muestras, es decir 75 variedades, presentó la mayor riqueza alélica. Además, estos resultados también se verían respaldados por estudios evolutivos (Hawkes, 1994; Spooner *et al.*, 2005a), que mencionan a la región de la sierra Sur del Perú como posible cuna de la papa cultivada a partir del complejo *S. brevicaulis*, por lo que se

esperaría un mayor polimorfismo. Otro factor bastante influyente en la riqueza alélica es la ploidia de las variedades que conforman una población. Por esta razón, la región Centro, conformada básicamente por diploides, presentó una riqueza alélica menor a la región Sur, conformada básicamente por tetraploides, a pesar de que sus tamaños muestrales fueron similares (72 y 75, respectivamente).

La mayor riqueza alélica de las papas nativas sobre las mejoradas reportadas aquí se puede deber a dos motivos: por el mayor número de variedades nativas sobre las mejoradas o por la supuesta base genética más amplia de las variedades nativas con respecto a las mejoradas. Las variedades mejoradas provienen de la combinación de solo unas pocas variedades de papa, básicamente del tipo *S. tuberosum*, y algunas especies nativas (de Haan *et al.*, 2010), es decir tienen una base genética estrecha (Spooner *et al.*, 2005a). En contraste, las variedades nativas adquieren un sin número de alelos por el intercambio de semillas entre productores, mutaciones favorecidas por las condiciones climáticas de los andes, y por un posible flujo génico con variedades silvestres (Quiroz *et al.*, 1992) Cuando se hicieron remuestreos *in silico* de las variedades nativas, de modo que se eligieron 28 de éstas cada vez (el mismo número que el de las variedades mejoradas), se observó que en promedio presentaban 158 alelos, lo que supera a los 148 alelos de las variedades mejoradas; siendo un buen indicio de la mayor riqueza alélica de las variedades nativas sobre las mejoradas, sin embargo, estas diferencias no fueron significativas ($P > \alpha$). Por lo tanto, se presume que la riqueza alélica es mayor en las variedades nativas debido a su tamaño muestral superior al de las mejoradas.

Los alelos comunes se deben al *pool* genético compartido por las variedades entre las diferentes regiones geográficas (variedades genéticamente parecidas), mientras que los alelos exclusivos se deberían básicamente al “pool” genético característico de cada región. Además se encontró que mientras más variedades tenga una región habrá una mayor probabilidad de encontrar un mayor número de alelos exclusivos, lo que indica

su relación con el tamaño muestral también. Por otra parte se encontró que un poco más de la mitad del total de alelos resultaron ser comunes entre las 3 regiones estudiadas, lo que respalda la amplia distribución de dichos alelos entre las zonas geográficas. Algo similar estaría ocurriendo cuando comparamos variedades nativas con mejoradas, al ser mayor el número de variedades nativas entonces van a presentar más cantidad de alelos exclusivos. Además es importante mencionar que prácticamente todos los alelos de las variedades mejoradas estaban presentes en las variedades nativas a excepción de solo 5, STI0003.148, STI0003.157, STI0032.127, STG0010.185, STG0010.187 (Ver Anexo IV B), lo que posiblemente se deba al tamaño muestral y a que las variedades mejoradas provienen básicamente de cruces entre variedades nativas.

VI.2.2. Heterocigosidad esperada

La heterocigosidad esperada (H_e) del presente estudio nos puede dar una idea de la diversidad genética a nivel alélico, es decir que su cálculo se basó en las frecuencias alélicas y no genéticas, en tal sentido solo representa una parte de la diversidad genética. La H_e de la muestra total tuvo un valor promedio de 0.73, confirmando el alto grado de diversidad genética en esta muestra de papa (Grover *et al.*, 2009).

En este trabajo agrupamos a las papas de Lambayeque y Cajamarca en la región Norte; a las de Huancavelica, Huánuco y Junín en la región Centro; y a las Cuzco y Puno en la región Sur. El departamento de Huánuco se conoce como el centro de mayor diversidad de diploides (de Haan, comunicación personal) mientras el departamento de Huancavelica, ubicado entre el centro y sur de los Andes peruanos, ha sido reportado como centro de diversificación genética de la papa (Torres, 2001; Huamán, 2002; de Haan, 2009). Sin embargo, en el presente trabajo se obtuvo la mayor H_e correspondía a las regiones Norte y Sur. Soto (2006) obtuvo resultados similares para la región Sur, al reportar a Cuzco con un PIC promedio superior al de

Huancavelica (en dicho estudio se calculó el PIC de la misma forma que He [Smith *et al.*, 1997]). Éstos resultados pueden verse apoyados en el hecho de que el origen de la papa cultivada fue en una vasta región del Sur del Perú al norte del lago Titicaca (Spooner *et al.*, 2005; Van den Berg y Jacobs, 2007). Al realizar el análisis de varianza (ANOVA), para determinar si existían diferencias entre las He promedio de las regiones ($\alpha = 0.05$), se observó que existían diferencias significativas ($P < 0.05$) entre la He promedio del Centro con las He promedio del Sur y Norte.

La fórmula corregida de la diversidad genética de Nei (1987) fue calculada como He para este trabajo; de modo que la He no solo depende del número de alelos presentes sino también de sus frecuencias (Smith *et al.*, 1997). En consecuencia el tamaño muestral (número de alelos) no es el único determinante en el cálculo de este índice de diversidad. Nuestros resultados refuerzan esta hipótesis ya que se observó que la He promedio de la región Norte (0.78), cuyo número muestral fue tan solo de 13, resultó ser significativamente mayor ($P > \alpha$) que la He promedio de la región Centro (0.67), con una muestra de 72 entradas. El menor valor de la He promedio se dio en la región del Centro, lo que probablemente se debe a que éstas básicamente eran variedades diploides (*S. stenotomun* y *S. goniocalix*) y cuentan con frecuencias alélicas poco similares a las variedades tetraploides (que eran mayoritarias en las demás regiones, sobre todo en la región Norte). En consecuencia, el número máximo de alelos distintos por variedad que presentarían los diploides serían hasta 2, mientras que los tetraploides podrían presentar hasta 4 alelos para un locus determinado, por lo que la He de las variedades diploides se vería desfavorecida.

Se cree que los cultivares modernos, variedades mejoradas en este estudio, representan una menor diversidad genética comparadas con las variedades nativas (Spooner *et al.*, 2005a). Sin embargo, según nuestros resultados la He promedio de las variedades mejoradas fue mayor que las nativas (0.76 contra 0.71), a pesar de tener un número muestral reducido en comparación con las nativas. No obstante, al

realizarse la prueba de hipótesis T de Student ($\alpha = 0.05$) se encontró que no habían diferencias significativas entre las H_e promedio de ambos grupos ($P > 0.05$). Una explicación para tales resultados es que las variedades nativas están compuestas básicamente por diploides y tetraploides, y las mejoradas netamente por tetraploides, por lo que las mejoradas tienen más probabilidad de poseer una mayor número de alelos que afecta positivamente a su H_e .

Si bien la base genética relativamente estrecha de algunos cultivares modernos puede influenciar negativamente sobre su diversidad genética (Ashkenazi *et al.*, 2001; Grover *et al.*, 2009), esto no necesariamente se cumplirá cuando tenemos un grupo diverso de cultivares modernos de papa, como lo son las variedades mejoradas peruanas que se analizaron en el presente estudio.

VI.3. Análisis de Varianza Molecular

El Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) nos ayuda a describir la variación genética dentro o entre grupos de poblaciones y a determinar estructuración entre poblaciones. En un principio se usó en el estudio de poblaciones humanas analizando perfiles de RFLP de DNA mitocondrial (Excoffier, *et al.* 1992). Más adelante AMOVA fue utilizado para el estudio de la ecología animal, vegetal y microbiana usando RAPDs, microsatélites y secuencias de DNA (Huff *et al.*, 1993; Paffeti *et al.*, 1998; Mengoni *et al.*, 2000), mientras se implementaban los análisis en poblaciones humanas (Barbujani *et al.*, 1996; Mendizabal *et al.*, 2011). De esta manera, se han realizado análisis AMOVA utilizando microsatélites en cultivos vegetales de importancia mundial. Así, Liu *et al.*, (2003) analizó la estructura genética entre grupos de líneas puras de maíz y determinó que el mayor porcentaje de variación genética se daba dentro de los grupos que entre ellos. En otro estudio (Pusadee *et al.*, 2009) se analizó el grado de diferenciación genética de una variedad nativa de arroz proveniente de diferentes subpoblaciones o villas, y se encontró una diferenciación genética significativa entre

éstas. Recientemente, de Haan *et al.* (2010) utilizó AMOVA para comparar la estructura genética de subpoblaciones de papas nativas del departamento de Huancavelica.

De acuerdo con el AMOVA la variación genética puede estar repartida dentro de las poblaciones o entre los grupos de poblaciones que asignemos. Podemos describir poblaciones como estructuradas genéticamente si encontramos que el porcentaje de variación entre las poblaciones o grupos de poblaciones es alto en comparación con la variación dentro de las poblaciones (Excoffier, *et al.* 1992). Es interesante determinar si existen diferencias entre las localidades dentro de una región, o entre regiones, en consecuencia, el análisis más indicado para este tipo de estudio es el Análisis de Varianza Molecular.

Cuando se agrupó a las papas de las distintas localidades por regiones geográficas se obtuvo que la principal fuente de variación genética (89,47%) es debido a las diferencias dentro de las localidades de cada región. Las diferencias entre las regiones y entre localidades dentro de una región aportaron a la variación genética total en un menor porcentaje (8,17% y 2,36% respectivamente); éstas fueron consecuencia de las distintas frecuencias génicas entre localidades y de alelos no compartidos entre ellas (de Haan *et al.*, 2010). Éstos resultados se ven respaldados por el trabajo realizado por de Haan *et al.*, (2010) con papas nativas de Huancavelica donde realizó el AMOVA entre dos regiones geográficamente distanciadas del centro y sur de Huancavelica y encontró que la principal fuente de variación genética se encontraba dentro de las poblaciones (colecciones *in situ*) locales que componían las regiones evaluadas, mientras la variación genética debida al agrupamiento por regiones y poblaciones dentro de las regiones fue limitada. Cuando se realizó un AMOVA más fino entre las regiones se determinó que la mayor variación genética interpoblacional entre pares de regiones se dio entre Norte y Centro (20.77%), lo cual es lógico si nos ponemos a analizar la composición de variedades de cada una de estas regiones. Por un lado la

región Norte se compone prácticamente en su totalidad de variedades tetraploides mejoradas (*S. tuberosum*) y por el otro la región Centro se encuentra conformada mayoritariamente por variedades diploides y solo unas cuantas variedades triploides (*S. chaucha*) y tetraploides (*S. tuberosum andigena*). Por lo tanto, debido a la composición heterogénea de variedades entre norte y centro, lo que involucra frecuencias alélicas distintas y alelos exclusivos, la variación entre estas regiones es pronunciada. La variación genética entre los demás pares (Norte – Sur y Centro – Sur) fue menor ya que su composición en cuanto a tipos de variedades es más homogénea. Además, ésta débil partición geográfica de la variación genética (sobre todo entre Norte – Sur y Centro – Sur) puede deberse además a la tasa alta de intercambio de semillas-tubérculos entre los agricultores andinos, sobre todo entre las zonas más cercanas (Zimmerer, 1991).

El AMOVA entre las variedades nativas y mejoradas determinó que la mayor fuente de variación genética se encuentra dentro de cada grupo (82.34%), mientras que la variación entre los grupos tiene un aporte considerable del 17.66% de la variación genética total. Estos resultados indican que existe una variabilidad genética apreciable dentro del grupo de las mejoradas, y además una diferenciación considerable entre las variedades nativas y mejoradas que puede estar siendo influenciada por las frecuencias alélicas distintas y el elevado número de alelos no compartidos entre estos grupos (31.25% del total de alelos).

VI.4. Análisis de agrupamiento

Es posible cuantificar las relaciones genéticas entre individuos en una determinada muestra o población calculando la distancia genética (geométrica) o disimilitud entre ellos. El coeficiente de Jaccard nos ayuda a calcular dicha disimilitud como la proporción de alelos no compartidos por dos individuos (IPGRI, 2003). Luego, en un análisis de agrupamiento se representara la disimilitud entre cada par de individuos

mediante un dendrograma. Entonces el dendrograma representará la diversidad del individuo con respecto a los demás miembros de la muestra. Asimismo, una alta disimilitud promedio en un conjunto de individuos puede representar una elevada diversidad genética en dicha muestra (de Haan, comunicación personal).

En el análisis de agrupamiento de la muestra se observó que el valor promedio del índice de disimilitud o coeficiente de Jaccard fue alto (0.625), lo que nos da una idea aproximada acerca de la diversidad genética de las muestras analizadas (Soto, 2006). Esto sería un indicio de que en promedio las muestras son genéticamente más diferentes que similares entre si, por lo tanto sería una prueba de la existencia de una gran variabilidad o diversidad genética en las papas aquí estudiadas.

De la topología del árbol se diferenciaron un total de 112 morfotipos y 153 haplotipos (que coincide con el número de haplotipos determinados en el programa Arlequín 3.5, basado en diferencias de alelos. Si bien los 153 haplotipos pertenecen a variedades únicas (141 haplotipos), duplicadas (9 haplotipos) o triplicadas (3 haplotipos), como se aprecia en la tabla 18, es bastante probable que algunos de estos haplotipos se hayan generado por error al momento de registrar alguno de sus alelos, de este modo un solo alelo mal registrado puede generar 2 haplotipos distintos. Ésto se observó en algunas variedades que incluían repeticiones como “Amarilis”, “Amarilla”, “Añil”, “Canchan”, “Capiro”, “Clon 30-3”, “Clon-51-15”, “Compis”, “Liberteña”, “Perricholi”, “Peruanita”, “Puca camotillo”, “Putis”, “Yana Qompis” y “Yungay”; que presentaron más de un haplotipo, cuando este debería ser único para todas las repeticiones. En consideración a esto y por la topología del árbol se podría afirmar que nuestras 168 variedades de papas incluyen 112 morfotipos genéticos constituidos por un haplotipo único o más haplotipos genéticamente similares; lo cual es indicio de una considerable diversidad genética en la muestra analizada.

Spooner *et al.*, (2007) realizaron una reevaluación taxonómica de la papa en base a 51 marcadores microsatélites, y mediante la caracterización genética y morfológica encontraron evidencias para afirmar que solo existían 4 especies de papa cultivada: *S. ajanhuiri*, *S. juzepczukii*, *S. curtilobum* y *S. tuberosum* con dos grupos (grupo Andigena, con variedades diploides, triploides y tetraploides; y grupo Chilotanum o de cultivares modernos). En el presente trabajo se realizó la caracterización genética de un grupo heterogéneo de variedades de papas con microsatélites del PGI-Kit (los cuales también habían sido utilizados en la investigación de Spooner) y en base a esta caracterización molecular se determinó un patrón de agrupamiento de “especies” muy parecido al estudio de Spooner, validando sus resultados.

Al analizar el dendrograma por identidad taxonómica se observó que el único clado que se sustenta bien por el *bootstrap* (98%) es el de *S. curtilobum* y *S. juzepczukii*, siendo este resultado congruente con otros estudios (Spooner *et al.*, 2007; de Haan *et al.* 2010). Este fue uno de los motivos por el cual se les ha asignado como especies distintas de *S. tuberosum*. Adicionalmente se encontraron variedades andigenas como “kuchillo Paki” que estaban fuera del clado de las variedades *tuberosum* tetraploides y más al lado de las variedades diploides. Una mala clasificación taxonómica sería la explicación más probable ya que el máximo número de alelos que presentó fue 3, es decir podría tratarse de un triploide y no tetraploide. Sin embargo, este resultado puede darse por la posibilidad de que todos los loci tengan al menos un par de alelos homocigotos. Otra explicación es el hecho de que los agricultores al momento de sembrar los cultivos de papa no los separan por especies y en consecuencia se pueden producir híbridos espontáneos interespecíficos (Sevilla y Holle, 2004), por tanto esta variedad genotípicamente estaría presentando características de ambos progenitores y por tanto su ubicación en el dendrograma sería intermedia. Un posicionamiento similar en el dendrograma sucede para las variedades andigenas “Oqi Biruntos” y “Uqi Biruntos”, a pesar de que su número de alelos coincide con su ploidia.

Las variedades “Puccya” (*S. stenotomun*), “Puca camotillo A” (*S. goniocalix*) y “Suito Paceña” (*S. goniocalix*) se ubican más cerca al grupo de las variedades tetraploides a pesar de haber sido clasificadas como especies diploides por sus características morfológicas. Además, éstas presentan un número mayor de alelos al esperado, presentando 4 alelos en más de un locus.

Al evaluar el agrupamiento desde el punto de vista regional se apreció una tendencia moderada de agrupamiento de acuerdo a la región geográfica de procedencia (sobre todo entre Sur y Centro), que estaba determinada por la ploidia de sus miembros. La explicación lógica para este fenómeno es que la región Sur estaba conformada básicamente por variedades tetraploides de la especie *S. tuberosum* y en menor grado por especies triploides y diploides, a excepción de *S. ajanhuiri* (Huamán, 1986), por lo que estarían formando un grupo más o menos diferenciado en la parte superior del dendrograma. En el caso de las variedades procedentes del Centro en su mayoría eran variedades diploides y solo algunas triploides lo cual justificaría la tendencia de este grupo a ubicarse en la parte inferior del dendrograma. Finalmente en el caso de las variedades del Norte, que prácticamente en su totalidad eran variedades mejoradas, a excepción de la variedad “Peruanita”, no se observó una tendencia de agrupación distinta de las demás regiones, sino más bien una sobreposición en el dendrograma con las otras regiones, sobre todo con la región Sur.

Si analizamos la distribución de cada región en el dendrograma se aprecia que las regiones del Sur y Centro poseen una importante diversidad genética que es determinada por el número de morfotipos que poseen y por el grado de diferenciación interna o disimilitud (0.618 y 0.585, respectivamente). Por su parte la región Norte debido a su número muestral reducido debería tener una menor diversidad genética; sin embargo, tuvo una disimilitud considerable (0.558) entre las variedades que la conforman, estadísticamente comparable con la disimilitud del Centro.

Cuando se evaluó el agrupamiento por variedades nativas o mejoradas se apreció que la mayoría de las variedades mejoradas se agrupaban en un extremo del dendrograma (salvo 4 haplotipos que caían en la zona del grupo de las nativas), lo que confirma la naturaleza tetraploide (4x) de las mejoradas, y es de esperar puesto que los programas de mejoramiento usan 4x como base. Estos resultados se ven apoyados en el estudio de Spooner *et al.*, (2007) donde se determinó que los cultivares modernos de la especie *S. tuberosum subsp. tuberosum* (equivalentes a las variedades mejoradas de nuestro estudio) se ubicaban en una pequeña región en un extremo del *clúster* de las variedades poliploides. Dicha estructuración sería reflejo que las mejoradas están más emparentadas entre sí que con las nativas, y a la vez nos indica que existe un acervo genético estrecho en las variedades mejoradas (Spooner *et al.*, 2005a; Grover *et al.*, 2009). Sin embargo, en nuestro estudio la distribución espacial de las variedades mejoradas en el dendrograma puede haber sido limitada por la muestra reducida de éstas en comparación con las variedades nativas, prácticamente en una proporción de 5 a 1. Además, la región en el dendrograma donde se agruparon la variedades mejoradas no es tan estrecha, puesto que la disimilitud entre ellas es considerable (0.556), y sumado a que algunas variedades mejoradas como CICA y Liberteña (15% del total de las mejoradas) se encuentran dispersas entre el grupo de las nativas, nos permite afirmar un par de puntos: (i) que la base o acervo genético de las variedades mejoradas peruanas no es tan estrecha y (ii) que las variedades mejoradas tienden a agruparse distintamente de las variedades nativas.

Analizando detalladamente la disposición de las variedades nativas y mejoradas se apreció que la variedad mejorada “CICA”, cruce de Ccompis x Clon 65-196 (SEINPA, 1994), se ubicó dentro del grupo de las variedades nativas, cerca del clado que contenía a las variedades nativas del tipo “Ccompis”, es decir uno de sus progenitores, quizás se deba al hecho que esta variedad mejorada proviene de un cruce único. En el caso de las variedades “Liberteña” (Alcca Tarma x Renacimiento) x (Chata Blanca de

Huasahuasi) (SEINPA, 1994) también se encontró fuera de la “cuña” de las variedades mejoradas, sin embargo, no se encontró asociación con sus progenitores puesto que dichas variedades no fueron incluidas en el presente estudio, además de ser progenitores múltiples. La distribución de las variedades nativas fue amplia en general y solo 3 de sus variedades, “Permata”, “Maco” y “Shoga Colorada”, se superponían en el grupo de las variedades mejoradas, no obstante no se halló una asociación directa con éstas.

Comparando los resultados de agrupamiento con la He y AMOVA para las regiones se noto cierta concordancia entre ellos. Al comparar las He promedio se determinó que la región Centro poseía una He inferior a los demás, lo que pudo deberse a sus frecuencias alélicas diferentes del resto de regiones, ya que eran en su mayoría diploides y las demás regiones tetraploides. Dichas frecuencias alélicas también intervinieron en el AMOVA, en este caso la mayor variación genética se dio entre regiones que casi no poseían tipos de variedades en común (Norte y Centro) y por lo tanto estaba influenciada por distintas frecuencias alélicas y alelos exclusivos. En el análisis de agrupamiento se apreció una tendencia de agrupación de las variedades diploides del Centro en la parte inferior del dendrograma y las variedades tetraploides del Sur en la parte superior. Este resultado parcial coincide con la diferenciación de las regiones debido al tipo de variedades que albergan y en consecuencia a sus frecuencias alélicas y alelos exclusivos.

En el caso de las variedades nativas y mejoradas los resultados del AMOVA mostraron que la variación genética entre ellas fue cercana al 18% del total, lo que podía determinar cierto grado de estructuración entre estas dos poblaciones. En el análisis de agrupamiento se observó dicha tendencia de agrupación de las variedades mejoradas, por lo cual coincidiría con los resultados de AMOVA. Las He promedio mostraron valores semejantes entre las variedades nativas y mejoradas (ligeramente superior para las variedades mejoradas, mas no estadísticamente significativo), lo que

estaría determinado por frecuencias alélicas equivalentes, mas no iguales, entre ambos grupos y poco influenciado por los alelos exclusivos que estarían en baja frecuencia (raros). Las frecuencias alélicas equivalentes entre dos poblaciones no necesariamente significan que el alelo "A" de una población "X" tenga la misma frecuencia en la población "Y", también podría significar que exista un alelo "B" en la población Y con la misma (o similar) frecuencia que el alelo A de la población X. En este sentido a pesar que las frecuencias de los alelos A y B difieran entre las poblaciones la He podría tener un valor similar para ambas puesto que en su cálculo no se considera la identidad de los alelos. Adicionalmente, el componente tetraploide de las variedades del Sur reducirían las diferencias de las frecuencias alélicas con las variedades del Norte. Por último, lo que se compara son las Heterocigosidades promedio de todos los microsatélites, lo que amortiguaría las diferencias entre frecuencias alélicas de las poblaciones. Por lo tanto, puede existir una diferenciación genética considerable entre las variedades nativas y mejoradas, debido a frecuencias alélicas distintas, que se evidencia por una estructuración en el dendrograma de las variedades mejoradas, a pesar de que sus He promedio sean similares.

VII. CONCLUSIONES

1. Los 23 marcadores microsatélites utilizados en el presente estudio han demostrado ser útiles para la caracterización genética molecular de las variedades de papas cultivadas más importantes del Perú (*Solanum* spp.).
2. El alto número de alelos compartidos entre las regiones del Norte, Centro y Sur nos permite concluir que existe un acervo genético común ampliamente distribuido.
3. La región Sur posee una diversidad genética mayor que las regiones Centro (riqueza alélica, He y disimilitud) y Norte (riqueza alélica y disimilitud).
4. La mayor fuente de variación genética entre las regiones es interna, mientras que la mayor variación genética interregional se da entre Centro y Norte.
5. Las variedades nativas poseen mayor diversidad genética que las mejoradas (riqueza alélica y disimilitud).
6. La mayor fuente de variación genética entre variedades nativas y mejoradas es interna, en tanto que la variación genética entre ellas es considerable.
7. Existen diferencias entre las frecuencias alélicas de las variedades diploides y tetraploides.
8. En cuanto al agrupamiento podemos concluir que las variedades diploides y tetraploides se agrupan distintamente en el dendrograma. Por otro lado, la mayoría de las variedades mejoradas peruanas tienden a agruparse distintamente de las variedades nativas.

VIII. RECOMENDACIONES

1. Mejorar las condiciones de amplificación para cada SSR del PGI kit, de manera que se eviten bandas inespecíficas que puedan alterar los análisis de variabilidad genética.
2. Previamente a la caracterización molecular se recomienda hacer una caracterización cromosómica de todas las variedades a analizar. Además hacer una reevaluación cromosómica de aquellos genotipos que no coincidieron con el número de alelos esperados con la finalidad de encontrar posibles híbridos naturales o loci duplicados.
3. En un posterior estudio se exhorta a buscar un número muestral equivalente entre las poblaciones a analizar de tal modo que los estimadores de la variabilidad genética no se vean sesgados por un distinto tamaño muestral. Por otro lado, se puede corregir los análisis por tamaño de muestra para reducir el sesgo por estas diferencias.
4. Continuar con los estudios de caracterización molecular de las variedades de papas cultivadas mediante el empleo de marcadores microsatélites para robustecer y mejorar los estudios de diversidad genética en papa.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ames, M. Validación de la selección de la colección núcleo de *Solanum tuberosum* subsp. *andigena* mediante el uso de marcadores microsatélites. Tesis para optar el Título Profesional de Biólogo-UNFV. 2003, Lima. pag: 48-63.
- Agencia Agraria de Noticias. 2013. <http://www.agraria.pe/noticias/peru-es-el-primer-productor-de-papa-en-sudamerica>.
- Andrade, D. Selección de la colección núcleo para *Solanum phureja* mediante el uso de marcadores microsatélites. Tesis para optar el Título Profesional de Biólogo-UNALM. 2001, Lima. pag: 57-71.
- Aranguren-Méndez, J. A., R. Román-Bravo, W. Isea, Y. Villasmil, y J. Jordana. Los microsatélites (STR's), marcadores moleculares de DNA por excelencia para programas de conservación: una revisión. ALPA. Arch. Latinoam. Prod. Anim. 2005. 13(1): 1-6
- Ashkenazi, V., Chani, E., Lavi, U., Levy, D., Hillel, J., y Veilleux, R. E. Development of microsatellite markers in potato and their use in phylogenetic and fingerprinting analyses. Genome, 2001. 44(1), 50–62.
- Barbujani G., Sterico M., Excoffier L., Nigro L. Mitochondrial DNA sequence variation across linguistic and geographic boundaries in Italy. Hum. Biol. 1996, 68: 201-215.
- Bradshaw, J.E. Potato-breeding strategy. En: Vreugdenhil, D. (ed.). Potato biology and biotechnology advances and perspectives. Elsevier, 2007 pp. 157-174.
- Bonierbale MW, Plaisted RL, Tanksley SD. RFLP maps based on a common set of clones reveal modes of chromosomal evolution in potato and tomato. Genetics, 1988. 120: 1095-1103
- Botstein, D., R. L. White, M. Skolnick y R. W. Davis. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. American Journal of Human Genetics. 1980, 32: 314-331.
- Bormann CA, Rickert AM, Ruiz RAC, Paal J, Lubeck J, Strahwald J, Buhr K and Gebhardt C. Tagging quantitative trait loci for maturity-corrected late blight resistance in tetraploid potato with PCR-based candidate gene markers. Mol. Plant Microbe Interact. 2004, 17 : 1126- 1138.
- Butler, J.M. Genetics and genomics of core STR loci used in human identity testing. J. Forensic Sci. 2006, 51(2): 253-265.
- Callen, D. F., Thompson, A. D., Shen, Y., Phillips, H. a, Richards, R. I., Mulley, J. C., y Sutherland, G. R. Incidence and origin of "null" alleles in the (AC)_n microsatellite markers. American journal of human genetics, 1993. 52(5), 922–7.
- Chambers, G. K., y MacAvoy, E. S. Microsatellites: consensus and controversy. Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry y molecular biology, 2000. 126(4), 455–76.

- Centro Internacional de la Papa. Protocolos de laboratorio de biología molecular en tipificación genética. Ghislain, M., Zhang, D y Herera, M. R. (Eds). Departamento de Recursos Genéticos. Manual de Capacitación CIP. 1997, Lima Perú.
- Cockerham, C. C. Variance of gene frequencies. *Evolution*, 1969. 23: 72-83.
- Cockerham, C. C. Analysis of gene frequencies. *Genetics*, 1973. 74: 679-700.
- Correll, D. S. The potato and its wild relatives. Contributions from Texas Research Foundation, Botanical Studies, 1962. 4: 1-606.
- Crawford DJ. Plant Molecular Systematics: Macromolecular Approaches. John Wiley and Sons, 1990. New York, USA.
- Cribb, P.J. and J. G. Hawkes. Experimental evidence for the origin of *Solanum tuberosum* subspecies *andigena*. In W. G. D'Arcy (ed.), *Solanaceae: Biology and Systematics*, 1986. 383-404. Columbia University Press, New York, NY, USA.
- De Haan S, Núñez J, Bonierbale M, y Ghislain M. Multilevel Agrobiodiversity and Conservation of Andean Potatoes in Central Perú. *Mountain Research and Development*, 2010. 30(3):222-231.
- Doyle, J. J. y Doyle, J. L. Isolation of DNA from small amounts of plant tissues. *BRL Focus*, 1990. 12: 13-15, modified at the Forest Biotechnology Lab at NCSU.
- Dubreuil P, Dufour P, Krejci E, Causse M, De Vienne D, Gallais A and Charcosset A. Organization of RFLP diversity among inbred lines of maize representing the most significant heterotic groups. *Crop Science*, 1996. 36:790–799.
- Engel, F. A. Explorations of the Chilca Canyon, Peru. *Current Anthropol.* 1970. 11: 55-58.
- Estrada, R. La Biodiversidad en el mejoramiento genético de la papa. PROINPA/CIA/CIP. 2000. Bolivia.
- Excoffier, L. G. Laval, and S. Schneider. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*, 2005. 1:47-50.
- Excoffier, L., Smouse, P., and Quattro, J. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, 1992. 131:479-491.
- Falush D, Stephens M and Pritchard J. Inference of population structure using multilocus genotype data: dominant markers and null alleles. *Molecular Ecology Notes*, 2007. 7 , 574–578.
- FAO. Estadísticas de producción de cultivos de la organización para la alimentación y agricultura de las Naciones Unidas (FAOSTAT 2013). Disponible en: http://faostat3.fao.org/home/index_es.html?locale=es#VISUALIZE.

- Feingold S, Lloyd J, Norero N, Bonierbale M and Lorenzen J. Mapping and characterization of new EST-derived microsatellites for potato (*Solanum tuberosum* L.). *Theor. Appl. Genet.*, 111 : 456-466.
- Felsenstein J. *Theoretical Evolutionary Genetics*. Genome Sciences 562 (Population Genetics). Seattle, 2013. Washington 98195-5065.
- Ferreira ME, Grattapaglia D. Introducción al uso de marcadores moleculares en el análisis genético. Traducido por Sánchez J, Sánchez A, Rodríguez L. Embrapa-spi: Embrapa-cenargen. 1998, vol. 20. Brasilia, Brasil. p. 38-56.
- Flagel, Lex E., Jonathan F. Wendel. Gene duplication and evolutionary novelty in plants. *New Phytologist*, 2009. 183: 557-564.
- Freeland, J. The evolution of population biology: past, present and future. *Journal of Biogeography*, 2005. 32: 2039–2040.
- Freville H, Justy F and Olivieri I. Comparative allozyme and microsatellite population structure in a narrow endemic plant species, *Centaurea corymbosa* Pourret (Asteraceae). 2001, *Molecular Ecology* 10:879–889.
- Ghislain, M., J. Núñez, M.R. Herrera y D.M. Spooner. The single Andigenum origin of *Neo-tuberosum*-*Tuberosum* potato materials is not supported by microsatellite and plastid marker analyses. *Theor. Appl. Genet.* 2009. 118(5), 963-969.
- Ghislain, M., Núñez, J., Rosario Herrera, M., Pignataro, J., Guzman, F., Bonierbale, M., y Spooner, D. M. Robust and highly informative microsatellite-based genetic identity kit for potato. *Molecular Breeding*, 2008. 23(3), 377–388.
- Ghislain, M., D. Andrade, F. Rodríguez, R.J. Hijmans y D.M. Spooner. Genetic analysis of the cultivated potato *Solanum tuberosum* L. Phureja Group using RAPDs and nuclear SSRs. *Theor. Appl. Genet.* 2006.113, 1515-1527.
- Ghislain M, Spooner D, Rodríguez F, Villamón F, Núñez J, Vásquez C, Waugh R, Bonierbale M. Selection of highly informative and user-friendly microsatellites (SSRs) for cultivated potato genotyping. *Theoretical Applied Genetics*, 2004. 108: 881-890.
- Ghislain M, Zhang D, Fajardo D, Huamán Z and Hijmans RJ. Marker-assisted sampling of the cultivated Andean potato *Solanum phureja* collection using RAPD markers. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 1999. 46:547–555.
- Goldstein, B. D. y C. Schlotterer C. *Microsatellites evolution and applications*. Oxford University Press, New York, 1999. p 352.
- Gómez R. Guía para las Caracterizaciones Morfológicas Básicas en Colecciones de Papas Nativas. Centro Internacional de la papa (CIP), Lima, 2000. Perú. 27 p
- Gomez R., Roca W., Ordinola M., Manrique K., y Julca P. *Papas nativas del Perú. Catalogo de variedades y usos gastronomicos*. Ministerio de agricultura. 2008. Primera edicion.

- Grover, A., Ramesh, B., y Sharma, P. C. Development of microsatellite markers in potato and their transferability in some members of Solanaceae. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 2009. 15(4), 343–358.
- Grun, P. The evolution of cultivated potatoes. *Econ. Bot.* 44, Supl. 1990. 3, 39-55.
- Hamrick JL y Godt MJW. Allozyme diversity in cultivated crops. *Crop Science*, 1997. 37:26–30.
- Hawkes J.G. Origins of cultivated Potatoes and Species Relationships. In: *Potato Genetics*. 1994. CAB International University Press UK Cambridge.
- Hawkes, J. G. History of the Potato In: *The potato Crop*. Ed. Paul Harris Chapman y Hall. London. 1992. Great Britain.
- Hawkes, J.G. y J. Francisco-Ortega. The potato in Spain during the late 16th century. *Econ. Bot.* 1992. 46(1), 86-97.
- Hawkes, J. G. The potato evolution biodiversity and genetic resources. Belhaven Press. London UK. 1990. p: 259.
- Hawkes, J. G. The origin of *Solanum jusepuczukii* Buk and *Solanum curtilobum* Juz. et Buk. *Z. Pflanzenzucht.* 1962. 47: 1-14.
- Hijmans, R.J., D.M. Spooner, A.R. Salas, A. Guarino y J. de la Cruz. Atlas of wild potatoes. Systematic and eco geographic studies on crop gene pools 10. 2002. International Plant Genetic Resources Institute, Roma.
- Holsinger, Kent E. y Weir B. "Genetics in geographically structured populations: defining, estimating and interpreting FST". *Nat Rev, Genet* 10 (9): 639–650.
- Hosaka, K. T-type chloroplast DNA in *Solanum tuberosum* L. ssp. *tuberosum* was conferred by some populations of *S. tarijense* Hawkes. *Amer. J. Potato Res.* 2003. 80, 21-32.
- Hosaka, K. Successive domestication and evolution of the Andean potatoes as revealed by chloroplast DNA restriction endonuclease analysis. *Theor. Appl. Genet.* 1995. 90: 356-363.
- Hosaka K, Hanneman RE Jr. The origin of the cultivated tetraploid potato based on chloroplast DNA. *Theor Appl Genet*, 1988.76: 172-176
- Hosaka, K., G.A. de Zoeten y R.E. Hanneman. Cultivated potato chloroplast DNA differs from the wild type by one deletion: vidence and implications. *TAG* 75, 1988. 741-745.
- Hosaka, K. Who is the mother of the potato? – Restriction endonuclease analysis of chloroplast DNA of cultivated potatoes. *Theor. Appl. Genet.* 1986. 72: 606-618.
- Hosaka K, Ogihara Y, Matsubayashi M, Tsunewaki K. Phylogenetic relationships between the tuberous *Solanum* species as revealed by restriction endonuclease analysis of chloroplast DNA. *Japanese Journal of Genetics.* 1984. 59, 349-369

- Huamán Z. Tecnología disponible para reforzar la conservación *insitu* de los cultivares de papa tradicionales de los Andes. Revista Electrónica de la Red Mundial de Científicos Peruanos, 2002. 1(1):1–10.
- Huamán, Z. y Spooner, D. M. Reclassification of Landrace Populations of Cultivated Potatoes (*Solanum* sect. *Petota*), American Journal of Botany, 2002. Vol. 89(6).
- Huamán, Z. Botánica Sistemática y Morfología de la Papa. En: Boletín de información Técnica 6. Centro Internacional de la Papa. 1986. Segunda edición. Lima Perú. P 22.
- Huamán, Z., J.G. Hawkes y Rowe P.R. A biosystematic study of the origin of the diploid potato, *Solanum ajanhuiri*. Euphytica, 1982. 31, 665-675.
- Huff D.R., Peakall R., Smouse P.E. RAPD variation within and among natural populations of outcrossing buffalograss [*Buchloe dactyloides* (Nutt.) Engelm]. Theor. Appl. Genet. 1993, 86: 927-934.
- Hurles M. Gene Duplication: The Genomic Trade in Spare Parts. PLoS Biol, 2004. 2(7): e206.
- International Potato Center (CIP). Potato Genetic Identity (PGI) kit: Protocols and reference ladders. Ma. del R. Herrera, M. Ghislain (eds.), Applied Biotechnology Laboratory Training Manual. 2008. Lima, Perú.
- IPGRI and Cornell University. Genetic diversity analysis with molecular marker data: Learning module. 2003. In Technical Bulletin Number 10.
- Jackson, M. T., Rowe, P. R. y Hawkes, J. G. Crossability relationships of Andean potato varieties of three ploidy levels. Euphytica 27:541-551. En: Estrada, N., 2000. La biodiversidad en el mejoramiento genético de la papa. 1978. P:41-42
- Juzepczuk, S.W. y S.M. Bukasov. A contribution to the question of the origin of the potato. Proc. USSR Congr. Genet. Plant Anim. Breed. 1929. 3, 592-611.
- Karp A, Edwards KJ, Bruford M, Funk S, Vosman B, Morgante M, Seberg O, Kremer A, Boursot P, Arctander P, Tautz D and Hewitt GM. Molecular technologies for biodiversity evaluation: opportunities and challenges. Nature Biotechnology, 1997. 15:625–628.
- Kephart SR. Starch gel electrophoresis of plant isozymes: a comparative analysis of techniques. American Journal of Botany, 1990. 77:693–712.
- Khush G. S. Y Beachell H. M. Breeding for disease resistance at IRRI. In Rice Breeding. IRRI, Manila. 1972. P 301-322.
- Kwok, P.Y., Deng, Q., Zakeri, H., Taylor, S.L., and Nickerson, D.A. Increasing the information content of STS-based genome maps: identifying polymorphisms in mapped STSs. Genomics, 1996. 31: 123-126.
- Lefort F, Douglas GC. Occurrence and detection of triploids by microsatellite analysis. In: Douglas GC ed. Strategies for improvement of forest tree species. Proceedings

- of the Teagasc/TDC Symposium on Forest Genetics, COFORD, Dublin, Ireland, 1999.19–35.
- Liu, K., Goodman, M., Muse, S., Smith, J. S., Buckler, E., y Doebley, J. Genetic structure and diversity among maize inbred lines as inferred from DNA microsatellites. *Genetics*, 2003. 165(4), 2117–28.
- Londoño J M. Estructura poblacional y diversidad genética de frijol común (*Phaseolus vulgaris L.*) En 202 genotipos por medio de SSR fluorescentes. Tesis para optar el título de biólogo. Universidad de Quindío. 2011. Armenia, Colombia.
- Matsubayashi, M. Phylogenetic relationship in the potato and its related species. p. 93-118. En: Tsuchiya T. y P.K. Gupta (eds.). *Chromosome engineering in plants: genetics, breeding, evolution*. 1991. Part B. Elsevier, Amsterdam.
- Mendizabal, I., Valente, C., Gusmão, A., Alves, C., Gomes, V., Goios, A., Parson, W., *et al.* Reconstructing the Indian origin and dispersal of the European Roma: a maternal genetic perspective. *PloS one*, 2011. 6(1), e15988.
- Mendoza, H. A. y F. L. Haynes. Genetic relationship among potato cultivars grown in the United States. *Hort. Science*, 1974. 9:328-330.
- Mengoni A., Gori A., Bazzicalupo M. The use of RAPD and SSR (microsatellite) variation for assessing genetic relationships among tetraploid alfalfa. *Plant Breeding*, 2000. 119: 311-318.
- Merino , C. Divergencia de loci microsatélites entre papas silvestres y cultivadas (Familia Solanacea Genero *Solanum* Seccion petota. Tesis de Título de Biología. UNMSM, 2006. Lima, Perú.
- Milbourne D, Meyer RC, Collins AJ, Ramsay LD, Gebhardt C and Waugh R Isolation, characterization and mapping of simple sequence repeat loci in potato. *Mol. Gen. Genet.* 1998, 259 : 233-245.
- Milbourne D, Meyer R, Bradshaw JE, Baird E, Bonar N, Provan J, Powell W and Waugh R. Comparison of PCR-based marker systems for the analysis of genetic relationships in cultivated potato. *Molecular Breeding*, 1997. 3:127–136.
- Miller, J. T. y Spooner D. M. Collapse of species boundaries in the wild potato *Solanum brevicaulle* complex (Solanaceae, S. sect: Petota): Molecular data. *Plant Systematics and Evolution*, 1999. 214: 103-130.
- Morgante M, Hanafey H and Powell W. Microsatellites are preferentially associated with nonrepetitive DNA in plant genome. *Nature Genetics*, 2002. 30:194–200.
- Moxon R., Wills C. DNA Microsatellites: Agents of Evolution?. *Scientific American*, 1999. p 94 – 99.
- Nagamine, Y. y M. Higuchi. Genetic distance and classification of domestics animals using genetic markers. *Journal of Animal Breeding and Genetics*. 2001. 118: 101-109.

- Neale D B. and Williams C G. Restriction fragment length polymorphism mapping in conifers and applications to forest genetics and tree improvement. *Canadian Journal of Forest Research*, 1991. 21:545–554.
- Nei, M y Kumar S. *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press, New York. 2000. p. 333.
- Nei, M. *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York, NY, USA. 1987. p 180.
- Nei, M. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*. 1973. 70: 3321-3323.
- Ochoa, C. M. *Las Papas de Sudamérica: Perú*. CIP. 1999.
- Paffetti D., Daguin F., Fancelli S., Gnocchi S., Lippi F., Scotti C., Bazzicalupo M. Influence of plant genotype on the selection of nodulating *Sinorhizobium meliloti* strains by *Medicago sativa*. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 1998.73: 3-8.
- Parani M, Singh KN, Rangasamy S and Ramalingam RS. Identification of *Sesamum alatum* × *Sesamum indicum* hybrid using protein, isozyme and RAPD markers. *Indian Journal of Genetics and Plant Breeding*, 1997. 57:381–388.
- Perrier X., Jacquemoud Collet J.P., 2006. DARwin software <http://darwin.cirad.fr/darwin>
- Prescott-Allen R. y Prescott-Allen, C. *Genes from the wild. Using Genetics Resources for Food and Raw Materials*. 1982. International Institute for Environment and Development. London.
- Provan, J., Powell, W., Waugh, R. Microsatellites analysis of relationships within cultivated potato (*Solanum tuberosum*). *Theoretical and Applied Genetics*. Springer – Verlag. 1996. 92: 1078 – 1084.
- Pusadee, T., Jamjod, S., Chiang, Y., Rerkasem, B., y Schaal, B. A. Genetic structure and isolation by distance in a landrace of Thai rice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2009. 106(33), 13880–5.
- Quiros, C. E, R. Ortega, L. van Raarnsdonk, M. Herrera-Montoya, P. Cisneros, E. Schmidt, and S. B. Brush. Increase of potato genetic resources in their center of diversity: The role of natural outcrossing and selection by the Andean farmer. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 1992. 39: 107-113.
- Reid A, Hof L, Esselink D and Vosman B. Potato cultivar genome analysis. *Methods Mol. Biol.* 2009, 508 : 295- 308.
- Ríos, D.M., M. Ghislain, F. Rodríguez y D.M. Spooner. What is the origin of the European potato? Evidence from Canary Island landraces. *Crop Sci.* 2007. 47, 127-128.
- Rochambeau, H., F. Fournet-Hanocq y J. Vu Tien Khang. Measuring and managing genetic variability in small populations. *Ann. Zootech.* 2000. 49: 77-93.

- Rodríguez, F., Ghislain, M., Clausen, A. M., Jansky, S. H., y Spooner, D. M. Hybrid origins of cultivated potatoes. TAG. Theoretical and applied genetics. Theoretische und angewandte Genetik, 2010. 121(6), 1187–98.
- Rodríguez, L. E. Origen y evolución de la papa cultivada, una revisión. Agronomía colombiana, 2010. 28(1), 9–17.
- Rohlf FJ. NTSYSpc: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System (Exeter Software, Setauket, NY), 1997. Version 2.0.
- Saitou N. y Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol Biol Evol 1987. 4 (4): 406-425.
- Salaman, R.N. y Hawkes J.G. The character of the early European potato. Proc. Linn. Soc. London 161, 1949. 71-84.
- Schlötterer C. The evolution of molecular markers—just a matter of fashion? Nature Reviews Genetics, 2004. 5:63–69.
- Schneider K and Douches DS. Assessment of PCR based simple sequence repeats to fingerprint North American potato cultivars. Am. Potato J. 1997, 74 : 149-160.
- SEINPA (Semilla e investigación en papa). Catálogo de semilla básica de papa en el Perú. 1994. Lima, Perú. Franco, E (ed. Tec.) 49 p.
- Sevilla, R. y Holle, M. Recursos Genéticos Vegetales. Ed. Torre Azul. 2004. Lima, Perú.
- Simmonds, N.W. Bananas. p. 370-375. En: Smartt, J. y N.W. Simmonds (eds.). Evolution of crop plants. 2nd ed. 1995. Longman Scientific y Technical, Harlow, UK.
- Smith, J. S. C., Chin, E. C. L., Shu, Li., Smith, O. S., Wall, S. J., Señor, M. L., Mitchell, S. E., Kresovich, S. y Ziegler, J. An evaluation of the utility of SSR loci as molecular markers in maize (*Zea mays* L.): comparisons with data from RFLP and pedigree. En: Theoretical and Applied Genetics. 1997. 95:163-173.
- Soto, J. Análisis de la diversidad genética de papa nativa (*Solanum* spp.) de los departamentos de Ayacucho, Cajamarca, Cuzco, Huancavelica y Puno, mediante el uso de marcadores microsatélites. Tesis de Título de Biología. UNMSM, 2006. Lima, Perú.
- Spooner DM, Nuñez J, Trujillo G, Herrera MR, Guzman F, Ghislain M. Extensive simple sequence repeat genotyping of potato landraces supports a major reevaluation of their gene pool structure and classification. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2007. 104:19398–19403.
- Spooner DM, Salas A. in Handbook of Potato Production, Improvement, and Post-Harvest Management (Haworth, Binghamton, NY), 2006. p 1–39.
- Spooner, D.M. y W.L.A. Hettterscheid. Origins, evolution, and group classification of cultivated potatoes. En: Motley, T.J., N. Zerega y H. Cross (eds.). Darwin's

- harvest: new approaches to the origins, evolution and conservation of crops. 2005. pp. 285-307. Columbia University Press, New York, NY.
- Spooner, D.M., J. Núñez, F. Rodríguez, P.S. Naik y Ghislain, M. Nuclear and chloroplast DNA reassessment of the origin of Indian potato varieties and its implications for the origin of the early European potato. *Theor. Appl. Genet.* 2005a. 110, 1020-1026.
- Spooner, D. M., McLean, K., Ramsay, G., Waugh, R., y Bryan, G. J. A single domestication for potato based on multilocus amplified fragment length polymorphism genotyping. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005b. 102(41), 14694–9.
- Spooner, DM, Hoekstra R, van den Berg RG, Martínez V. *Solanum* sect. *Petota* in Guatemala: taxonomy and genetic resources. *Amer. J. Potato Res.* 1998. 75:3-17
- StataCorp. *Stata Statistical Software: Release 11*. 2009. College Station, TX: Stata Corp LP.
- Sukhotu, T., O. Kamijima y K. Hosaka. Chloroplast DNA variation in the most primitive cultivated diploid potato species *Solanum stenotomum* Juz. *et* Buk. and its putative wild ancestral species using high-resolution markers. *Genet. Resour. Crop Evol.* 2006. 53, 53-63.
- Sukhotu, T. y K. Hosaka. Origin and evolution of Andigena potatoes revealed by chloroplast and nuclear DNA markers. *Genome*, 2006. 49, 636-647.
- Tang J, Baldwin SJ, Jacobs JME, van der Linden CG, Voorrips RE, Leunissen JAM, van Eck H and Vosman B. Large-scale identification of polymorphic microsatellites using an in silico approach. *BMC Bioinformatics*, 2008. 9 : 374.
- Tanksley SD, Ganai MW, Prince JP, de-Vicente MC, Bonierbale MW, Broun P, Fulton TM, Giovannoni JJ, Grandillo S, Martin GB, Messeguer R, Miller JC, Miller L, Paterson AH, Pineda O, Roder MS, Wing RA, Wu W and Young ND. High density molecular linkage maps of the tomato and potato genomes. *Genetics*, 1992. 132 : 1141-1160.
- Torres J. *Estrategia y plan de acción de la biodiversidad para el departamento de Huancavelica como base de su desarrollo sostenible*. 2001. Lima, Peru: Comunidad Andina.
- Ugent, D. The potato: what is the origin of this important crop plant, and how did it first become domesticated? *Science*. 1970. 170, 1161-1166.
- USDA. Base de datos del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos. 2011. Enlace: <http://ndb.nal.usda.gov/>.
- Van den Berg, R.G. y M.J. Jacobs. Capítulo 4: Molecular taxonomy. En: Vreugdenhil, D. (ed.). *Potato biology and biotechnology advances and perspectives*. 2007. p. 55-74. Elsevier, Amsterdam.
- Van Eck H, Rouppe van der Voort J, Draaistra J, van Zandvoort P, van Enckervort E, Segers B, Peleman J, Jacobsen E, Helder J, Bakker J. The inheritance and

- chromosomal localization of AFLP markers in a non-inbred potato offspring. *Mol Breed*, 1995. 1: 397-410.
- Van Os H, Andrzejewski S, Bakker E, Barrena I, Bryan GJ, Caromel B, Ghareeb B, Isidore E, de Jong W, van Koert P, Lefebvre V, Milbourne D, Ritter E, Ruppe van der Voort JNAM, Rousselle-Bourgeois F, van Vliet J, Waugh R, Visser RGF, Bakker J and van Eck HJ. Construction of a 10,000-marker ultradense genetic recombination map of potato: providing a framework for accelerated gene isolation and a genomewide physical map. *Genetics*, 2006. 173 : 1075-1087.
- Vasquez, A. V. Mejoramiento genético de la papa. Primera edición Amaru editors – CONCYTEC. 1988. Lima-Perú.
- Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, van de Lee T, Hornes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M and Zabeau M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, 1995. 23:4407–4414.
- Weir, B. S. Genetic data analysis II. Methods for discrete population genetic data. Sinauer Associates, INC. Publishers, Sunderland, Massachusetts. 1996. 283 p.
- Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA and Tingey SV. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, 1990. 18:6531–6535.
- Wright, S. Evolution and the Genetics of Populations. Vol. 4. 1978. Variability Within and Among Natural Populations. Univ. of Chicago Press, Chicago.
- Wright, S. The genetical structure of populations. *Ann.Eugen.* 1951. 15: 323-354.
- Wright, S. The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. *Evol*, 1965. 19: 395-420.
- Young WP, Schupp JM and Keim P. DNA methylation and AFLP marker distribution in the soybean genome. *Theoretical and Applied Genetics*, 1999. 99:785– 792.
- Zimmerer KS. The regional biogeography of native potato cultivars in highland Peru. *Journal of Biogeography*, 1991. 18:165–178.

X. ANEXOS

Anexo I

Preparación de reactivos

Extracción de DNA

Tampón de extracción CTAB 2X

Stock	Final	100 mL
CTAB	2%	2 g
NaCl 5M	1.4M	28 mL
EDTA 0.5M, pH 8.0	20mM	4 mL
Tris HCl 1M, pH 8.0	100mM	10 mL
PVP	1%	1 g
H ₂ O destilada		completar a 100 mL

El tampón puede ser almacenado a temperatura ambiente

Tampón de extracción CTAB 10X

Stock	Final	100 ml
CTAB	10%	10 g
NaCl	0.7M	4.09 g
EDTA 0.5M, pH 8.0	20mM	4 mL
Tris HCl 1M, pH 8.0	100mM	10 mL
PVP	1%	1g
H ₂ O destilada		completar a 100 mL

Buffer T₁₀E₁

Stock	Final	1 L
Tris HCl 1M, pH 8.0	10mM	10 mL
EDTA 0.5M, pH 8.0	1mM	2 mL
H ₂ O destilada		completar a 1000 mL

Esterilizar en autoclave y almacenar a 20 °C

ARNasa 10mg/ml

Stock	Final	5 ml
ARNasa	10 mg/mL	50 mg
Tris HCl 1M, pH 7.5	10mM	50 µL
NaCl 5M	15mM	15 µL
H ₂ O destilada		completar a 5 mL

Preparación de geles de agarosa

Preparación de geles de agarosa al 1%

Stock	Final	100 mL
Agarosa	1%	1 g
TBE 1X	1X	100 mL
Bromuro de Etidio 10mg/ml	0.1 µg/mL	1 µL

Tampón de carga para geles de agarosa SALB 10X

Stock	Final	50 mL
AzuL de bromofenol	0.15%	75 mg
Xilen cianol	0.15%	75 mg
Naranja G	0.20%	100 mg
Sucrosa	60%	30 g
TBE 10X	0.5X	2.5 mL
H ₂ O destilada MilliQ		completar a 50mL

Fago *Lambda* cortado con la enzima *Pst I*

Stock	concentración	volumen
DNA <i>Lambda</i>	50ng/µL	200 µL
<i>Pst I</i>	3µL/ug DNA	30 µL
Buffer 10X		90 µL
BSA		9 µL
SALB	10X	100 µL
H ₂ O destilada		completar 100 mL

Incubar los componentes a 37°C por 2 horas antes de agregar SALB

Preparación de geles desnaturalizantes de poliacrilamida en el sistema LI-COR.

Solución stock de acrilamida 6% + urea 7M

Stock	Final	1000 ml
Acrilamida	6%	60 g
Bisacrilamida	0.30%	3 g
Urea	7M (42%)	420 g
TBE 10X	0.5X	50 mL
H ₂ O destilada		completar a 1000 mL

Preparación de geles de poliacrilamida usados en LI-COR.

- Para preparar geles de 25 cm de largo se filtran 60 ml de la solución de acrilamida al 6 % + urea 7M a 4 °C, mediante un sistema de membranas.

- Se agregó 400 μL de APS al 10% por cada 60mL de solución de acrilamida y se mezcla suavemente.
- Antes de verter el gel al molde se agregó 40 μL de TEMED. A partir de este momento se dispone de 3 a 5 minutos para colocar el gel líquido en el molde antes de que polimerice y se vuelva sólido.
- La solución de acrilamida con APS y TEMED se colocó en una jeringa de 60 mL de capacidad para tener mayor facilidad a la hora de verterla al molde.
- Se vertió a través de la jeringa la solución del gel por un extremo del molde (que básicamente consiste en dos láminas de vidrio de 25 x 25 cm unidas por ganchos, con un pequeño espacio entre ellas) cuidando que no se formen burbujas.
- Una vez que el espacio entre las placas ha sido cubierto se colocó los peines que servirán de molde para los pocillos en los cuales se depositó las muestras de DNA amplificado y se dejó gelificar.

Preparación de Buffers

Tampón TBE 10X

Stock	Final	1000 mL
	90mM	
Tris base	(10.8%)	108 g
Acido bórico	5.50%	55 g
EDTA 0.5M, pH 8.0	20mM	40 mL
H ₂ O destilada MilliQ		completar a 1000 mL

Preparación del tampón Tris HCl 1M pH 8.0

Stock	800 mL
Tris base	96.8 gr
Llevar a pH 8.0 con HCl concentrado	

Preparación del Buffer para la reacción de PCR BOB 10X

Stock	concentración	100 mL
Tris base	1M	12,11 gr
(NH ₄) ₂ SO ₄	200mM	2,64 gr
MgCl ₂ .6H ₂ O	25mM	0,51 gr
H ₂ O MilliQ		completar 100 mL

Autoclavar y llevar a pH 9.0

Anexo II

Procedencia de las 168 variedades de papa cultivadas (*Solanum* spp.) más importantes del Perú (incluidas las variedades mantenidas en el CIP). Se indican la ploidía, en base a citometría de flujo, y la especie asignada, en base a caracteres morfológicos, realizados por personal del CIP. Existen casos en que los datos provistos por la citometría de flujo no concuerdan con la especie asignada, por lo que se coloca un signo de interrogación (?) al final del nombre de la posible especie. Adg: *S. tuberosum* subsp. *andigena*, Stn: *S. stenotomun*, Gon: *S. goniocalix*, Cha: *S. chaucha*, Cur: *S. curtilobum*, Tub (Hyb): *S. tuberosum* (mejorada), Juz: *S. juzepczsukii* y Phu: *S. phureja*.

n	código de trabajo CIP	Nombre de la variedad	Ploidía	especie	Categoría	Lugar de procedencia	Región
1	box1A1	Manua	4	Adg	Nativa	Huancavelica	centro
2	box1A2	Trajin	4	Adg	Nativa	Huancavelica	centro
3	box1A3	Walas	3	Cha	Nativa	Huancavelica	centro
4	box1A4	Marquina	4	Adg	Nativa	Huancavelica	centro
5	box1A5	Cocharcas	4	Adg	Nativa	Huancavelica	centro
6	box1A6	Wingo	2	Gon	Nativa	Huancavelica	centro
7	box2An145	Yurac Chucharcas	4	Adg	Nativa	Huancavelica	centro
8	box1A8	Puccya	3	Stn (?)	Nativa	Huancavelica	centro
10	box1A10	Butijuylla	3	Cha	Nativa	Huancavelica	centro
12	box1A12	Frescos	4	Adg	Nativa	Huancavelica	centro
13	box1A13	Promesa	3	Cha	Nativa	Huancavelica	centro
14	box1A14	Puca Suito	3	Cha	Nativa	Huancavelica	centro
15	box1A15	Duses	2	Gon	Nativa	Huancavelica	centro
16	box1A16	Yana Palta	4	Adg	Nativa	Huancavelica	centro
17	box1A17	Yana Shiri	4	Cur (?)	Nativa	Huancavelica	centro
18	box1A18	Limeña	2	Gon	Nativa	Quilcas	centro
19	box1A19	Mauna	2	Stn	Nativa	Quilcas	centro
20	box2Bn157	Maco	4	Adg	Nativa	Quilcas	centro
21	box1A21	Pichi Rosa	3	Cha	Nativa	Quilcas	centro
22	box1A22	Puca huayro	3	Cha	Nativa	Quilcas	centro
23	box1A23	Wuacrash Blanco	2	Stn	Nativa	Quilcas	centro
24	box1A24	Pepino	3	Cha	Nativa	Quilcas	centro
25	box1A25	Culi Marca negro	4	Adg	Nativa	Quilcas	centro
26	box1A26	Peruanita	2	Gon	Nativa	Quilcas	centro
27	box1A27	Compis	4	Adg	Nativa	Puno Illpa	sur
28	box1A28	Chaska	4	Tub (hyb.)	Nativa	Puno Illpa	sur
29	box1A29	Piñaza	3	Juz	Nativa	Puno Illpa	sur
30	box1A30	Sani Imilla	4	Adg	Nativa	Puno Illpa	sur
32	box1A32	Imilla Blanca	4	Adg	Nativa	Puno Illpa	sur
33	box1A33	Imilla Roja	4	Adg	Nativa	Puno Illpa	sur
34	box1A34	San Juan	4	Adg	Nativa	Puno Illpa	sur
35	box1A35	Andina	4	Adg (hyb.)	Mejorada	Puno Illpa	sur
36	box1A36	Imilla Negra	2	Adg (?)	Nativa	Puno Illpa	sur
37	box1A37	Locka	3	Juz	Nativa	Puno Illpa	sur
38	box1A38	Shoga Colorada	4	Adg	Nativa	Puno Illpa	sur
39	box1A39	Oqi Biruntos	4	Adg	Nativa	Cusco I	sur
40	box1A40	Uqi Biruntos	4	Adg	Nativa	Cusco I	sur

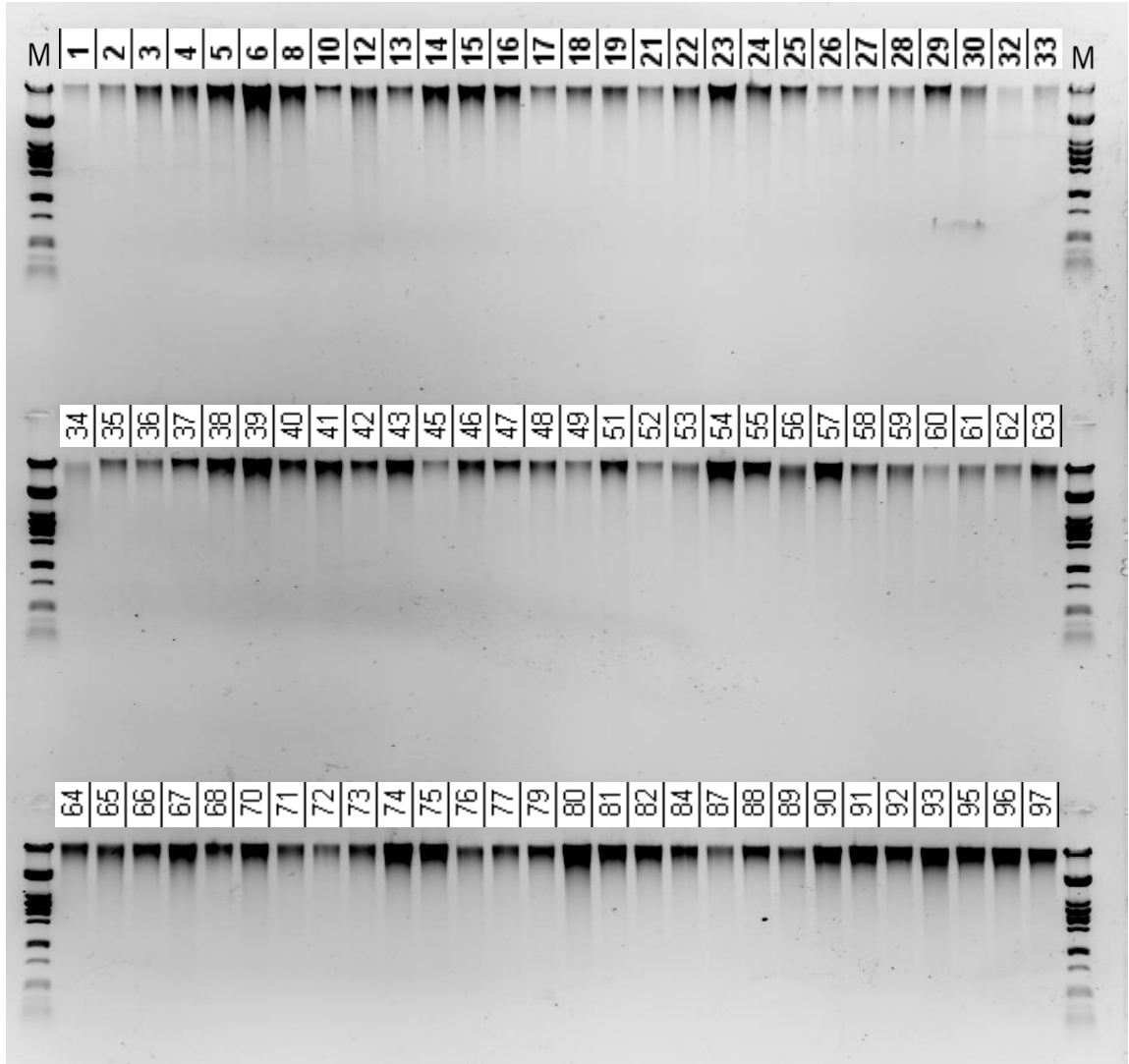
41	box1A41	Yana Qompis	4	Adg	Nativa	Cusco I	sur
42	box1A42	Walta	4	Adg	Nativa	Cusco I	sur
43	box1A43	Kuchillo Paki	4	Adg	Nativa	Cusco I	sur
44	box2Bn152	Yana Kusi	4	Adg	Nativa	Cusco I	sur
45	box1A45	Pata Yaqta	3	Cha	Nativa	Cusco I	sur
46	box1A46	Maqtillu	4	Adg	Nativa	Cusco I	sur
47	box1A47	Azul Waña	5	Cur	Nativa	Cusco I	sur
48	box1A48	Yana Qompis	4	Adg	Nativa	Cusco I	sur
49	box1A49	Puka Qompis	4	Adg	Nativa	Cusco I	sur
50	box2Bn167	Walaychu	4	Adg	Nativa	Cusco I	sur
51	box1A51	Pakucha Sinka	4	Adg	Nativa	Cusco I	sur
52	box1A52	Kuchipa Akan	4	Adg	Nativa	Cusco I	sur
53	box1A53	Yuraq Sika	4	Adg (hyb.)	Nativa	Cusco I	sur
54	box1A54	Tika Bole	4	Adg	Nativa	Cusco I	sur
55	box1A55	Kose	4	Adg	Nativa	Cusco I	sur
56	box1B56	Chalcka	4	Tub (hyb.)	Nativa	Cusco I	sur
57	box1B57	Puka Bole	4	Adg	Nativa	Cusco I	sur
58	box1B58	CICA	4	Tub (hyb.)	Mejorada	Cusco II	sur
59	box1B59	CICA	4	Tub (hyb.)	Mejorada	Cusco II	sur
60	box1B60	Perricholi	4	Tub (hyb.)	Mejorada	Cusco II	sur
61	box1B61	Perricholi	4	Tub (hyb.)	Mejorada	Cusco II	sur
62	box1B62	Canchan	4	Tub (hyb.)	Mejorada	Cusco II	sur
63	box1B63	Clon-51-15	4	Tub (hyb.)	Nativa	Cusco II	sur
64	box1B64	Clon-51-15	4	Tub (hyb.)	Nativa	Cusco II	sur
65	box1B65	Clon 30-3	4	Tub (hyb.)	Nativa	Cusco II	sur
66	box1B66	Valisha	4	Adg (hyb.)	Nativa	Cusco II	sur
67	box1B67	Mariva	4	Tub (hyb.)	Mejorada	Cusco II	sur
68	box1B68	Yungay	4	Tub (hyb.)	Mejorada	Cusco II	sur
69	box2An144	Capiro	4	Tub (hyb.)	Mejorada	Cusco II	sur
70	box1B70	Capiro	?	Tub (hyb.)	Mejorada	Cusco II	sur
71	box1B71	UNICA	?	Tub (hyb.)	Mejorada	Cusco II	sur
72	box1B72	Amarilis	4	Tub (hyb.)	Mejorada	Cusco II	sur
73	box1B73	Chasqa	4	Tub (hyb.)	Mejorada	Cusco II	sur
74	box1B74	Janacaya	4	Adg	Nativa	Cusco II	sur
75	box1B75	Suito Paceña	2	Gon	Nativa	Cusco II	sur
76	box1B76	Compis	4	Adg	Nativa	Cusco II	sur
77	box1B77	Huacac Ccalluq	4	Adg	Nativa	Cusco II	sur
78	box2Bn164	Permata	4	Adg	Nativa	Cusco II	sur
79	box1B79	Muro	4	Cha (?)	Nativa	Cusco II	sur
80	box1B80	Putis	4	Adg	Nativa	Cusco II	sur
81	box1B81	Casa Huamanero	4	Adg	Nativa	Cusco II	sur
82	box1B82	Huancar Quilla	4	Adg	Nativa	Cusco II	sur
84	box1B84	Yurac Qellwa	4	Adg	Nativa	Cusco II	sur
85	box2Bn154	Cajetilla	4	Adg	Nativa	Cusco II	sur
86	box2Bn161	Chalhuina	4	Adg	Nativa	Cusco II	sur
87	box1B87	Ccompis	4	Adg	Nativa	Cusco II	sur
88	box1B88	Quequerano		Gon	Nativa	Cusco II	sur
89	box1B89	Revolucion	4	Tub (hyb.)	Mejorada	Cusco II	sur
90	box1B90	Capuli	2	Gon	Nativa	Huanuco	centro
91	box1B91	Amarilla Jaspeado	2	Gon	Nativa	Huanuco	centro
92	box1B92	Runtush	2	Gon	Nativa	Huanuco	centro
93	box1B93	Yana Tumbay	2	Gon	Nativa	Huanuco	centro
94	box2An149	Negracha	4	Adg	Nativa	Huanuco	centro

95	box1B95	Wisculpa Atacan	2	Gon	Nativa	Huanuco	centro
96	box1B96	Peruanita	2	Gon	Nativa	Huanuco	centro
97	box1B97	Tumay	2	Gon	Nativa	Huanuco	centro
98	box1B98	Ambarina	2	Gon	Nativa	Huanuco	centro
99	box1B99	Garwash Pishgosh	2	Gon	Nativa	Huanuco	centro
100	box1B100	Liberteña	4	Tub (hyb.)	Mejorada	Cajamarca	norte
101	box1B101	Yungay Rojo	4	Tub (hyb.)	Mejorada	Cajamarca	norte
102	box1B102	Amarilis	4	Tub (hyb.)	Mejorada	Cajamarca	norte
103	box1B103	Molinera	4	Tub (hyb.)	Mejorada	Cajamarca	norte
105	box1B105	Yungay	4	Tub (hyb.)	Mejorada	Cajamarca	norte
106	box1B106	Perricholi	4	Tub (hyb.)	Mejorada	Cajamarca	norte
107	box1B107	Maria Huanca	4	Tub (hyb.)	Mejorada	Cajamarca	norte
108	box1B108	Peruanita	2	Gon	Nativa	Cajamarca	norte
109	box1B109	Canchan	4	Tub (hyb.)	Mejorada	Cajamarca	norte
111	box1B111	Yungay Llama	4	Tub (hyb.)	Mejorada	Lambayeque	norte
112	box2A112	Perricholi Llama	4	Tub (hyb.)	Mejorada	Lambayeque	norte
113	box2A113	Liberteña Cutervo	4	Tub (hyb.)	Mejorada	Lambayeque	norte
114	box2A114	Calhua Rosada	2	Stn	Nativa	CIP	?
115	box2A115	China Runtush	?	Gon	Nativa	CIP	?
116	box2A116	Maria Cruz	?	Gon	Nativa	CIP	?
117	box2A117	Chingos	2	Stn	Nativa	CIP	?
118	box2A118	Ambar	?	hyb	Nativa	CIP	?
119	box2A119	EE-2057	?	Adg	Nativa	CIP	?
120	box2A120	Ch'apiña	2	Phu	Nativa	CIP	?
121	box2An141	Cceccorani	2	Stn	Nativa	CIP	?
122	box2A122	Romano	3	Cha	Nativa	Huancavelica	centro
123	box2A123	Amarilla	2	Gon	Nativa	Quilcas	centro
124	box2A124	Yana Huancay	3	Cha	Nativa	Quilcas	centro
125	box2A125	Wuacrash Rojo	2	Gon	Nativa	Quilcas	centro
127	box2A127	Puka Lomo	4	Adg	Nativa	Cusco I	sur
128	box2A128	Canchan	4	Tub (hyb.)	Mejorada	Cusco II	sur
129	box2A129	Clon 30-3	4	Tub (hyb.)	Nativa	Cusco II	sur
130	box2A130	Amarilis	4	Tub (hyb.)	Mejorada	Cusco II	sur
131	box2A131	Puca Palta	4	Adg	Nativa	Cusco II	sur
132	box2A132	Huayro Puka	4	Cha (?)	Nativa	Cusco II	sur
133	box2A133	Añil	3	Cha	Nativa	Cusco II	sur
134	box2A134	Sucollo	4	Adg	Nativa	Cusco II	sur
135	box2A135	Puca Putis	2	Stn	Nativa	Cusco II	sur
137	box2Bn170	Moro Orqo	2	Stn	Nativa	Cusco II	sur
139	box2A139	Peruanita	2	Gon	Nativa	Cusco II	sur
140	box2A140	Pucamama	?	Adg	Nativa	Cusco II	sur
141	box2A141	Ayaviri	4	Adg	Nativa	Cusco II	sur
143	box2A143	Yanacahuina	4	Adg	Nativa	Cusco II	sur
145	box2A145	Azucar Cantina	2	Gon	Nativa	Huanuco	centro
146	box2A146	Yana Pishgosh	2	Gon	Nativa	Huanuco	centro
148	box2A148	Yana Rayhuana	2	Gon	Nativa	Huanuco	centro
149	box2A149	Puca camotillo (A	2	Gon	Nativa	Huanuco	centro
150	box2A150	Amarilla Hualianca	2	Gon	Nativa	Huanuco	centro
151	box2A151	Añil	2	Gon	Nativa	Huanuco	centro
152	box2A152	Puka Pishgosh	2	Gon	Nativa	Huanuco	centro
153	box2A153	Amarilis Cutervo	4	Tub (hyb.)	Mejorada	Lambayeque	norte
155	box2A155	Puca camotillo (B)	2	Gon	Nativa	Huanuco	centro
156	box2Bn166	Muru Callhuas	?	?	Nativa	Junin	centro

157	box2Bn169	Amarilla puka ñahui	?	?	Nativa	Junin	centro
158	box2An138	Pumapa maqui rojo	?	?	Nativa	Junin	centro
159	box2Bn163	Mashua papa	?	?	Nativa	Junin	centro
160	box2Bn159	Huayro Macho	?	?	Nativa	Junin	centro
161	box2Bn150	Unchunchaqui	?	?	Nativa	Junin	centro
162	box2An142	Callhuas morado	?	?	Nativa	Junin	centro
163	box2Bn153	Yana huilo morado	?	?	Nativa	Junin	centro
164	box2An143	Talmish	?	?	Nativa	Junin	centro
165	box2An139	Cceccorani	?	?	Nativa	Junin	centro
166	box2An137	Huari huayta	?	?	Nativa	Junin	centro
167	box2An146	Camotillo rojo (gor)	?	?	Nativa	Junin	centro
168	box2Bn168	Huansa	?	?	Nativa	Junin	centro
169	box2Bn155	Putis	?	?	Nativa	Junin	centro
170	box2An148	Asno zapato	?	?	Nativa	Junin	centro
171	box2Bn162	Huayta chuco	?	?	Nativa	Junin	centro
172	box2Bn160	Yana murunqui	?	?	Nativa	Junin	centro
173	box2Bn151	Callhuay	?	?	Nativa	Junin	centro
174	box2Bn156	Perdizpa runtu	?	?	Nativa	Junin	centro
175	box2Bn165	Camotillo rojo	?	?	Nativa	Junin	centro
176	box2Bn173	Caramelo	?	?	Nativa	Junin	centro
177	box2Bn171	Papa morada	?	?	Nativa	Junin	centro
178	box2An140	Muru camotillo	?	?	Nativa	Junin	centro
179	box2An147	Yuracmac rojo	?	?	Nativa	Junin	centro
180	box2Bn172	Huayta vaso	?	?	Nativa	Junin	centro
181	box2Bn158	Chilis runtus	?	?	Nativa	Junin	centro

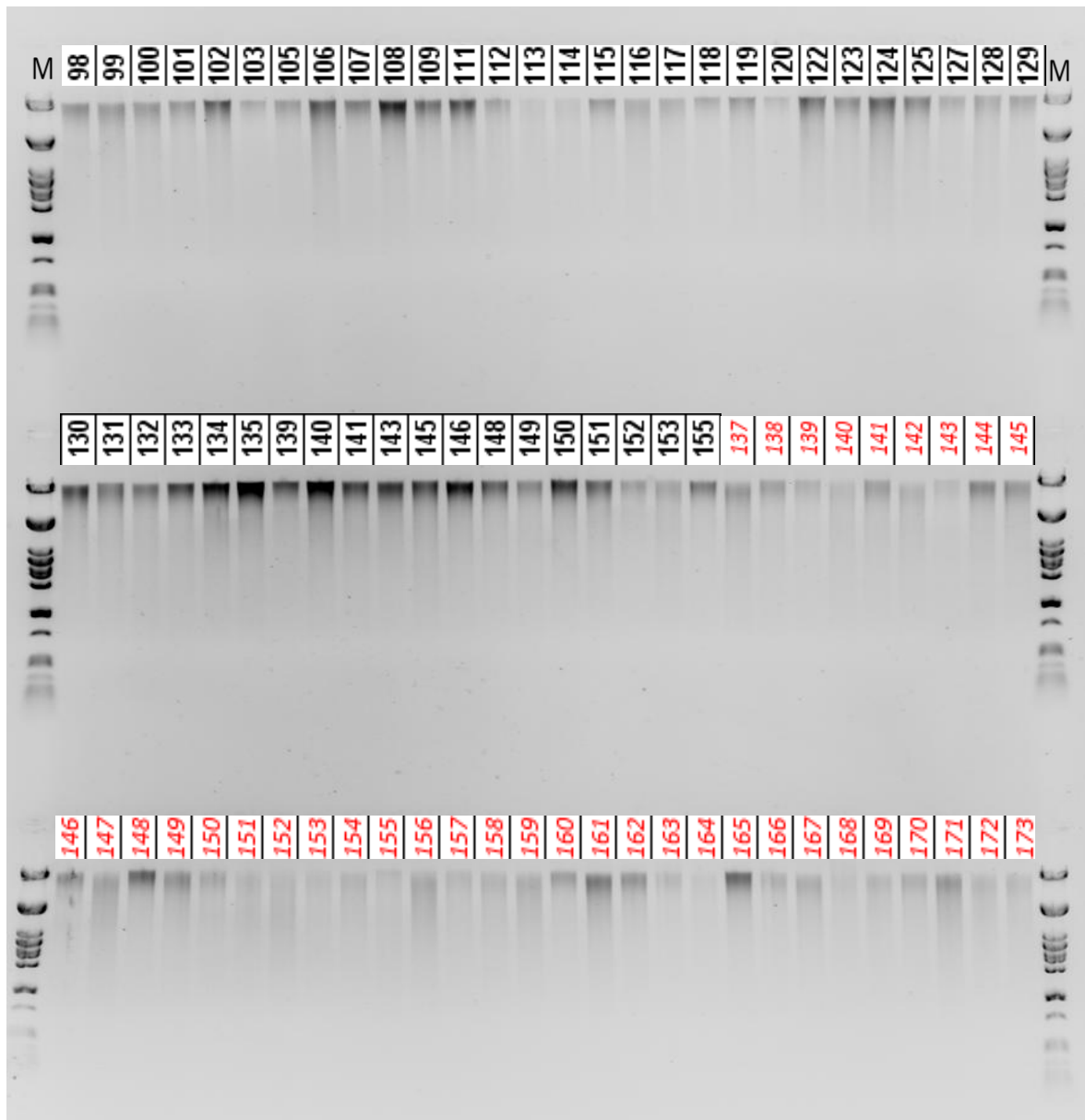
Anexo III

A. Evaluación del DNA extraído de las 168 variedades de papas cultivadas más importantes del Perú mediante electroforesis en geles de agarosa al 1%.



M: Marcador fago *Lambda* digerido con la enzima de restricción *Pst I*. Las diferentes variedades se muestran ordenadas según el código de trabajo en el laboratorio del CIP. En negro se notan el primer lote de muestras provenientes de la estación de Huancayo del CIP, y en rojo el segundo lote provenientes de la misma estación. A estas últimas se les nominó con el sufijo "n" antes del numeral en el código de trabajo que se muestra en el anexo II.

B. Evaluación del DNA extraído de las 168 variedades de papas cultivadas más importantes del Perú mediante electroforesis en geles de agarosa al 1%.



M: Marcador fago *Lambda* digerido con la enzima de restricción *Pst I*. Las diferentes variedades se muestran ordenadas según el código de trabajo en el laboratorio del CIP. En negro se notan el primer lote de muestras provenientes de la estación de Huancayo del CIP, y en rojo el segundo lote provenientes de la misma estación. A estas últimas se les nombró con el sufijo “n” antes del numeral en el código de trabajo que se muestra en el anexo II.

Anexo IV

A. Tablas de frecuencias alélicas por regiones

Microsatélite	Tamaño (pb) y frecuencia de los alelos en la región Norte							
	131	137	140	143	149	152		
STI0033	131	137	140	143	149	152		
	0.371	0.057	0.029	0.057	0.286	0.200		
STI0003	148	149	157	158	167	170	176	179
	0.024	0.098	0.024	0.268	0.268	0.122	0.171	0.024
STI0032	127	136	138	139	141	142	145	
	0.071	0.429	0.036	0.071	0.036	0.179	0.179	
STI0030	104	106	107	108	109	115	118	125
	0.133	0.222	0.111	0.067	0.222	0.067	0.067	0.111
STM0031	185	195	197	203	205			
	0.100	0.050	0.050	0.600	0.200			
STM1053	186	189	190					
	0.286	0.464	0.250					
STI0001	194	197	203	206	209	212		
	0.094	0.375	0.063	0.188	0.031	0.250		
STI0014	138	139	143	145	148			
	0.034	0.379	0.069	0.310	0.207			
STG0001	139	142	144	146	150	151	154	157
	0.030	0.030	0.061	0.303	0.333	0.061	0.030	0.152
STI0004	95	107	112	118	121			
	0.520	0.040	0.320	0.080	0.040			
STM0037	91	93	97	99	105	107		
	0.382	0.235	0.088	0.088	0.059	0.147		
STG0016	143	148	151	154				
	0.235	0.088	0.294	0.382				
STM1106	157	160	169	175	178			
	0.250	0.219	0.344	0.125	0.063			
STM1064	206	209	211	213				
	0.520	0.320	0.120	0.040				
STI0012	183	186	189	191	201	204	207	
	0.029	0.200	0.314	0.029	0.257	0.114	0.057	
STM5114	299	305	308	314				
	0.086	0.343	0.257	0.314				
STM5121	300	301	303	306	309			
	0.286	0.071	0.321	0.214	0.107			
STG0010	177	180	182	184	187			
	0.233	0.033	0.367	0.333	0.033			
STG0025	214	215	219					
	0.190	0.619	0.190					
STM1104	183	186	189	190	195			
	0.115	0.308	0.192	0.269	0.115			
STPoAc58	245	248	249					
	0.158	0.316	0.526					
STM1052	225	226	227	235	243	244	245	
	0.031	0.313	0.156	0.188	0.031	0.250	0.031	
STM5127	255	257	258	263	266	285	288	
	0.097	0.226	0.065	0.097	0.161	0.129	0.226	

Microsatélite	Tamaño (pb) y frecuencia de los alelos en la región Centro											
STI0033	131	137	140	143	149	155						
	0.922	0.013	0.013	0.026	0.013	0.013						
STI0003	149	158	167	170	173	176	179	188	208			
	0.007	0.380	0.033	0.400	0.040	0.047	0.067	0.020	0.007			
STI0032	130	133	135	136	138	139	141	142	145	148		
	0.006	0.006	0.044	0.288	0.013	0.244	0.044	0.325	0.025	0.006		
STI0030	106	107	108	109	112	115	118	121				
	0.243	0.075	0.069	0.301	0.069	0.023	0.214	0.006				
STM0031	185	195	196	197	203	205	211					
	0.403	0.022	0.015	0.007	0.455	0.030	0.067					
STM1053	183	186	189	190	192							
	0.007	0.191	0.461	0.333	0.007							
STI0001	194	197	200	203	212							
	0.482	0.409	0.022	0.007	0.080							
STI0014	136	138	139	142	145	148	151	154				
	0.008	0.008	0.068	0.060	0.481	0.346	0.015	0.015				
STG0001	136	139	141	142	146	148	149	150	152	154		
	0.053	0.068	0.098	0.015	0.293	0.015	0.030	0.398	0.015	0.015		
STI0004	83	92	95	98	101	107	112	118	121			
	0.009	0.026	0.626	0.043	0.087	0.017	0.078	0.104	0.009			
STM0037	89	91	93	95	101	105	107	133				
	0.142	0.488	0.094	0.008	0.024	0.134	0.102	0.008				
STG0016	137	143	148	151	154	157	160	172				
	0.007	0.205	0.021	0.151	0.459	0.041	0.021	0.096				
STM1106	145	157	160	163	169	172	175	178	181			
	0.092	0.190	0.120	0.007	0.134	0.113	0.225	0.077	0.042			
STM1064	206	208	209	213								
	0.818	0.114	0.057	0.011								
STI0012	183	186	188	189	191	204	207	234				
	0.042	0.021	0.084	0.343	0.014	0.399	0.063	0.035				
STM5114	299	302	305	308	310	314						
	0.007	0.021	0.191	0.404	0.007	0.369						
STM5121	300	301	303	306	309							
	0.416	0.128	0.192	0.152	0.112							
STG0010	176	177	180	181	182	192						
	0.008	0.427	0.076	0.008	0.473	0.008						
STG0025	211	214	215	219								
	0.009	0.299	0.615	0.077								
STM1104	183	186	187	189	190	192	193	195				
	0.067	0.274	0.006	0.171	0.055	0.024	0.140	0.262				
STPoAc58	245	247	248	249	251	255	256	261				
	0.183	0.017	0.108	0.408	0.075	0.025	0.167	0.017				
STM1052	226	227	235	243	244	245	256					
	0.252	0.056	0.091	0.266	0.294	0.014	0.028					
STM5127	248	254	255	258	263	266	269	276	285	288	291	
	0.006	0.019	0.049	0.105	0.346	0.049	0.093	0.037	0.167	0.123	0.006	

Microsatélite	Tamaño (pb) y frecuencia de los alelos en la región Sur													
STI0033	131	137	140	143	149	152								
	0.544	0.066	0.044	0.132	0.132	0.081								
STI0003	149	158	167	170	173	176	179	188	208					
	0.063	0.302	0.176	0.234	0.023	0.050	0.104	0.036	0.014					
STI0032	127	130	133	135	136	138	139	141	142	145	148			
	0.026	0.021	0.067	0.010	0.320	0.041	0.062	0.021	0.273	0.149	0.010			
STI0030	104	106	107	108	109	112	115	118	121	125				
	0.087	0.235	0.096	0.143	0.157	0.039	0.065	0.100	0.013	0.065				
STM0031	185	195	196	197	203	205	211							
	0.286	0.048	0.065	0.042	0.411	0.113	0.036							
STM1053	180	183	186	187	189	190	192							
	0.011	0.011	0.322	0.017	0.394	0.228	0.017							
STI0001	194	197	200	203	206	209	212							
	0.277	0.335	0.027	0.085	0.027	0.037	0.213							
STI0014	138	139	142	143	145	148	151							
	0.065	0.219	0.018	0.024	0.278	0.379	0.018							
STG0001	136	139	141	142	144	146	148	149	150	151	152	154	157	161
	0.025	0.019	0.074	0.006	0.037	0.265	0.037	0.093	0.340	0.037	0.006	0.019	0.037	0.006
STI0004	83	92	95	98	101	107	112	118	121					
	0.020	0.034	0.503	0.074	0.128	0.013	0.121	0.054	0.054					
STM0037	89	91	93	95	97	99	101	105	107	109	133			
	0.036	0.399	0.119	0.006	0.024	0.083	0.048	0.054	0.179	0.018	0.036			
STG0016	137	143	148	151	154	157	160	172						
	0.014	0.259	0.038	0.146	0.311	0.090	0.038	0.104						
STM1106	145	157	160	163	166	169	172	175	178	181	190	211		
	0.047	0.188	0.059	0.029	0.024	0.235	0.135	0.176	0.071	0.012	0.006	0.018		
STM1064	201	206	207	208	209	211	213							
	0.009	0.647	0.026	0.026	0.164	0.103	0.026							
STI0012	183	186	188	189	191	192	201	204	207	210				
	0.076	0.108	0.011	0.308	0.027	0.011	0.054	0.265	0.135	0.005				
STM5114	299	302	305	308	311	314								
	0.042	0.036	0.214	0.339	0.010	0.359								
STM5121	300	301	303	306	307	309								
	0.409	0.036	0.226	0.241	0.058	0.029								
STG0010	176	177	180	182	184	185	187							
	0.029	0.343	0.137	0.383	0.086	0.011	0.011							
STG0025	211	214	215	219										
	0.026	0.145	0.624	0.205										
STM1104	183	186	187	189	190	192	193	195						
	0.091	0.309	0.011	0.086	0.114	0.017	0.223	0.149						
STPoAc58	245	247	248	249	251	253	255	256	259	263				
	0.134	0.021	0.141	0.366	0.042	0.028	0.021	0.204	0.007	0.035				
STM1052	214	225	226	227	235	239	243	244	245	256				
	0.017	0.011	0.259	0.103	0.178	0.017	0.132	0.253	0.006	0.023				
STM5127	248	254	255	257	258	263	266	269	276	285	288			
	0.014	0.037	0.047	0.070	0.130	0.135	0.028	0.098	0.023	0.209	0.209			

B. Tablas de frecuencias alélicas por el tipo de variedad

Microsatélite	Tamaño (pb) y frecuencia de los alelos en las variedades nativas													
	131	137	140	143	149	152	155							
STI0033	131	137	140	143	149	152	155							
	0.778	0.045	0.040	0.080	0.045	0.006	0.006							
STI0003	149	158	167	170	173	176	179	188	208					
	0.021	0.341	0.095	0.338	0.027	0.039	0.098	0.030	0.012					
STI0032	130	133	135	136	138	139	141	142	145	148				
	0.012	0.046	0.028	0.292	0.025	0.160	0.037	0.314	0.077	0.009				
STI0030	104	106	107	108	109	112	115	118	121	125				
	0.019	0.244	0.081	0.119	0.236	0.061	0.044	0.167	0.011	0.017				
STM0031	185	195	196	197	203	205	211							
	0.365	0.039	0.039	0.021	0.432	0.049	0.056							
STM1053	180	183	186	187	189	190	192							
	0.007	0.010	0.243	0.010	0.420	0.295	0.016							
STI0001	194	197	200	203	206	209	212							
	0.409	0.365	0.030	0.030	0.003	0.014	0.149							
STI0014	136	138	139	142	143	145	148	151	154					
	0.004	0.035	0.113	0.046	0.014	0.385	0.378	0.018	0.007					
STG0001	136	139	141	142	144	146	148	149	150	151	152	154	157	161
	0.045	0.049	0.102	0.011	0.004	0.263	0.030	0.068	0.383	0.011	0.015	0.011	0.004	0.004
STI0004	83	92	95	98	101	107	112	118	121					
	0.016	0.029	0.576	0.058	0.107	0.016	0.086	0.086	0.025					
STM0037	89	91	93	95	97	99	101	105	107	109	133			
	0.105	0.451	0.105	0.008	0.008	0.023	0.038	0.098	0.128	0.011	0.026			
STG0016	137	143	148	151	154	157	160	172						
	0.012	0.228	0.025	0.148	0.385	0.068	0.028	0.108						
STM1106	145	157	160	163	166	169	172	175	178	181	190	211		
	0.069	0.192	0.093	0.021	0.014	0.192	0.127	0.182	0.069	0.027	0.003	0.010		
STM1064	201	206	207	208	209	211	213							
	0.006	0.787	0.006	0.062	0.101	0.017	0.022							
STI0012	183	186	188	189	191	192	201	204	207	210	234			
	0.056	0.056	0.046	0.330	0.017	0.007	0.017	0.350	0.099	0.003	0.020			
STM5114	299	302	305	308	310	311	314							
	0.013	0.033	0.179	0.394	0.003	0.003	0.374							
STM5121	300	301	303	306	307	309								
	0.434	0.084	0.197	0.181	0.016	0.088								
STG0010	176	177	180	181	182	184	192							
	0.021	0.411	0.121	0.004	0.426	0.014	0.004							
STG0025	211	214	215	219										
	0.018	0.249	0.613	0.120										
STM1104	183	186	187	189	190	192	193	195						
	0.069	0.302	0.006	0.132	0.069	0.022	0.186	0.214						
STPoAc58	245	247	248	249	251	253	255	256	259	261	263			
	0.169	0.024	0.117	0.379	0.065	0.016	0.024	0.185	0.004	0.008	0.008			
STM1052	214	225	226	227	235	239	243	244	245	256				
	0.010	0.007	0.230	0.071	0.135	0.010	0.206	0.291	0.014	0.027				
STM5127	248	254	255	257	258	263	266	269	276	285	288	291		
	0.011	0.028	0.054	0.011	0.122	0.244	0.037	0.108	0.034	0.188	0.159	0.003		

Microsatélite	Tamaño (pb) y frecuencia de los alelos en las variedades mejoradas																			
STI0033	131	137	140	143	149	152														
	0.350	0.050	0.013	0.113	0.263	0.213														
STI0003	148	149	157	158	167	170	173	176	179	188										
	0.011	0.136	0.011	0.273	0.273	0.114	0.023	0.136	0.011	0.011										
STI0032	127	130	136	138	139	142	145													
	0.101	0.014	0.377	0.043	0.072	0.203	0.188													
STI0030	104	106	107	108	109	115	118	125												
	0.192	0.202	0.111	0.051	0.192	0.061	0.051	0.141												
STM0031	185	195	196	197	203	205														
	0.118	0.020	0.039	0.059	0.490	0.275														
STM1053	186	189	190																	
	0.345	0.483	0.172																	
STI0001	194	197	203	206	209	212														
	0.092	0.368	0.132	0.132	0.053	0.224														
STI0014	138	139	143	145	148															
	0.048	0.403	0.032	0.290	0.226															
STG0001	141	142	144	146	149	150	151	154	157											
	0.013	0.013	0.092	0.329	0.026	0.289	0.066	0.039	0.132											
STI0004	92	95	98	101	107	112	118	121												
	0.018	0.500	0.036	0.054	0.018	0.250	0.054	0.071												
STM0037	91	93	97	99	101	105	107													
	0.346	0.192	0.064	0.141	0.013	0.051	0.192													
STG0016	143	148	151	154	157	160	172													
	0.272	0.074	0.222	0.346	0.037	0.025	0.025													
STM1106	145	157	160	169	172	175	178													
	0.031	0.203	0.125	0.266	0.031	0.250	0.094													
STM1064	206	207	208	209	211	213														
	0.475	0.034	0.034	0.237	0.203	0.017														
STI0012	183	186	189	191	201	204	207													
	0.067	0.173	0.293	0.053	0.187	0.133	0.093													
STM5114	299	305	308	311	314															
	0.103	0.333	0.244	0.013	0.308															
STM5121	300	301	303	306	307	309														
	0.255	0.036	0.345	0.255	0.073	0.036														
STG0010	177	180	182	184	185	187														
	0.206	0.029	0.382	0.309	0.029	0.044														
STG0025	214	215	219																	
	0.071	0.667	0.262																	
STM1104	183	186	187	189	190	193	195													
	0.150	0.300	0.017	0.150	0.233	0.067	0.083													
STPoAc58	245	248	249	256	263															
	0.109	0.217	0.543	0.065	0.065															
STM1052	225	226	227	235	243	244														
	0.016	0.391	0.156	0.188	0.063	0.188														
STM5127	254	255	257	258	263	266	285	288												
	0.028	0.042	0.250	0.069	0.111	0.083	0.194	0.222												

Anexo V

A. Heterocigosidad esperada por SSR calculada para cada región

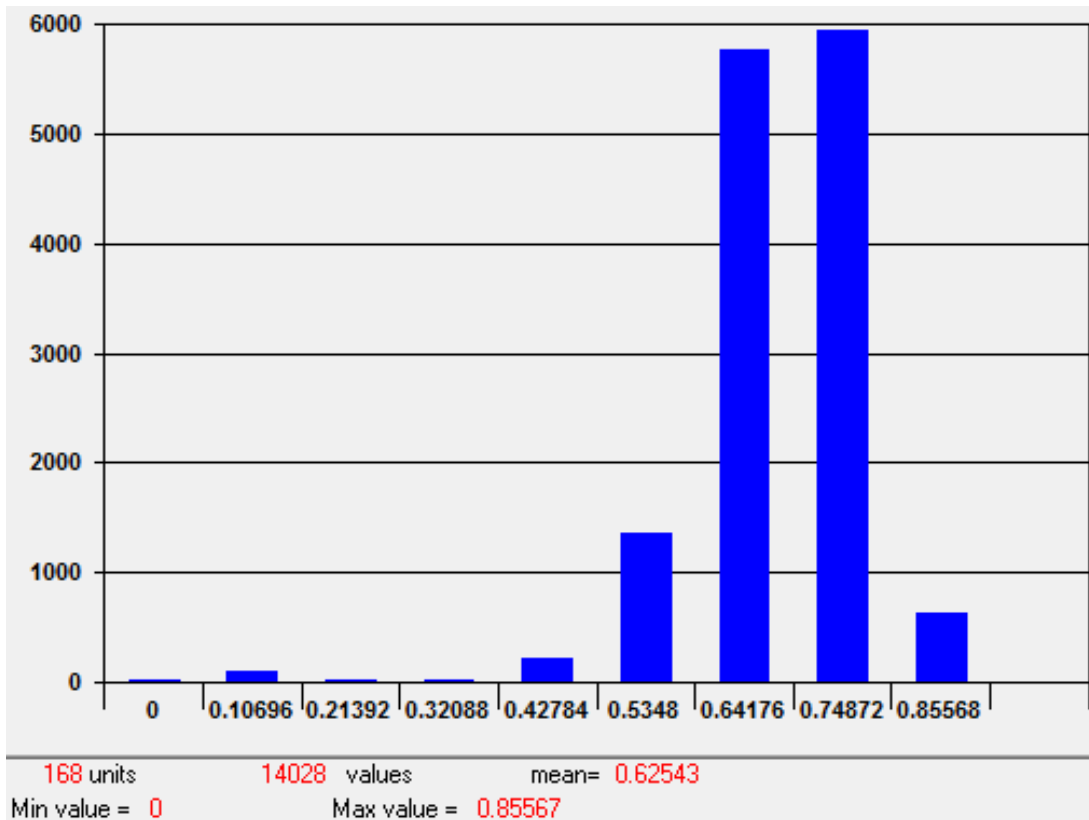
MICROSATELLITE		Índice de Contenido Polimórfico - PIC		
		Sur	Centro	Norte
1	STI0033	0.66	0.15	0.79
2	STI0003	0.81	0.70	0.87
3	STI0032	0.80	0.76	0.80
4	STI0030	0.87	0.80	0.92
5	STM0031	0.74	0.63	0.63
6	STM1053	0.70	0.65	0.69
7	STI0001	0.77	0.60	0.81
8	STI0014	0.74	0.65	0.77
9	STG0001	0.80	0.75	0.83
10	STI0004	0.71	0.59	0.67
11	STM0037	0.79	0.71	0.82
12	STG0016	0.80	0.72	0.76
13	STM1106	0.86	0.86	0.81
14	STM1064	0.55	0.32	0.66
15	STI0012	0.81	0.72	0.84
16	STM5114	0.72	0.67	0.77
17	STM5121	0.73	0.75	0.82
18	STG0010	0.72	0.60	0.76
19	STG0025	0.55	0.53	0.59
20	STM1104	0.81	0.81	0.83
21	STPoAc58	0.79	0.76	0.65
22	STM1052	0.82	0.78	0.84
23	STM5127	0.87	0.82	0.90
PROMEDIO		0.76	0.67	0.78

B. Heterocigosidad esperada por SSR calculada para cada tipo de variedad

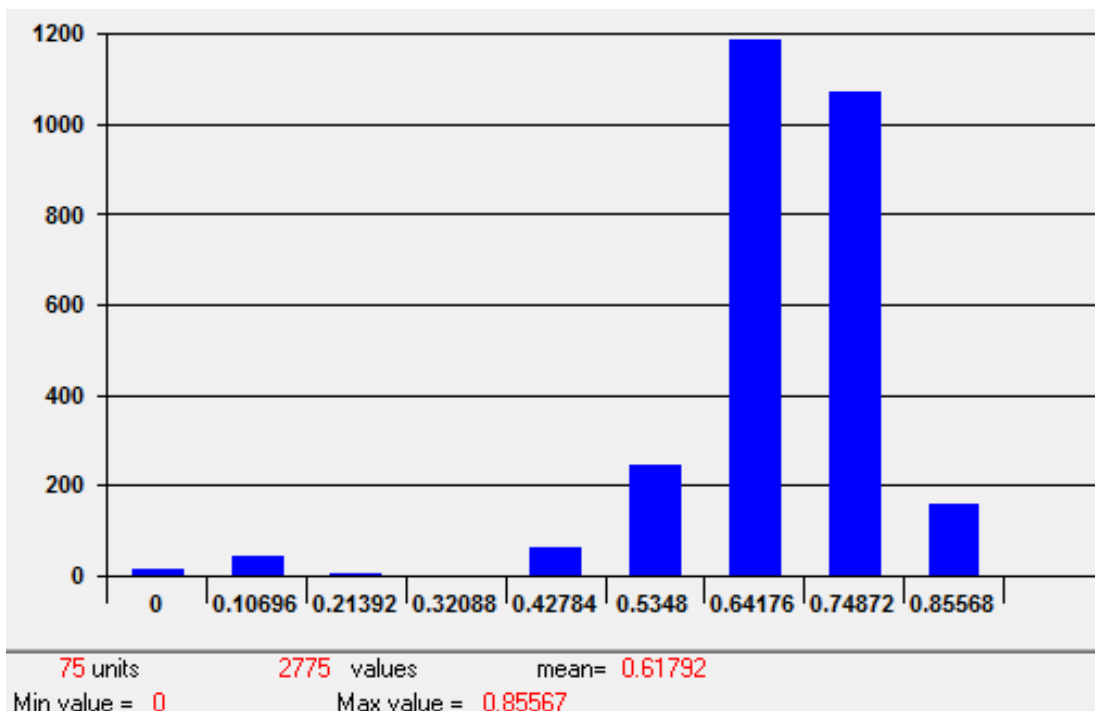
MICROSATELLITE		Índice de Contenido Polimórfico - PIC		
		Total	Nativas	Mejoradas
1	STI0033	0.56	0.38	0.78
2	STI0003	0.78	0.75	0.83
3	STI0032	0.79	0.79	0.79
4	STI0030	0.85	0.84	0.88
5	STM0031	0.69	0.68	0.69
6	STM1053	0.68	0.68	0.64
7	STI0001	0.72	0.68	0.80
8	STI0014	0.72	0.70	0.72
9	STG0001	0.78	0.77	0.80
10	STI0004	0.65	0.64	0.70
11	STM0037	0.77	0.75	0.81
12	STG0016	0.77	0.77	0.78
13	STM1106	0.86	0.86	0.83
14	STM1064	0.47	0.37	0.70
15	STI0012	0.78	0.75	0.85
16	STM5114	0.70	0.68	0.75
17	STM5121	0.74	0.73	0.77
18	STG0010	0.68	0.64	0.74
19	STG0025	0.55	0.55	0.50
20	STM1104	0.81	0.81	0.83
21	STPoAc58	0.77	0.78	0.66
22	STM1052	0.80	0.80	0.78
23	STM5127	0.86	0.85	0.85
PROMEDIO		0.73	0.71	0.76

Anexo VI

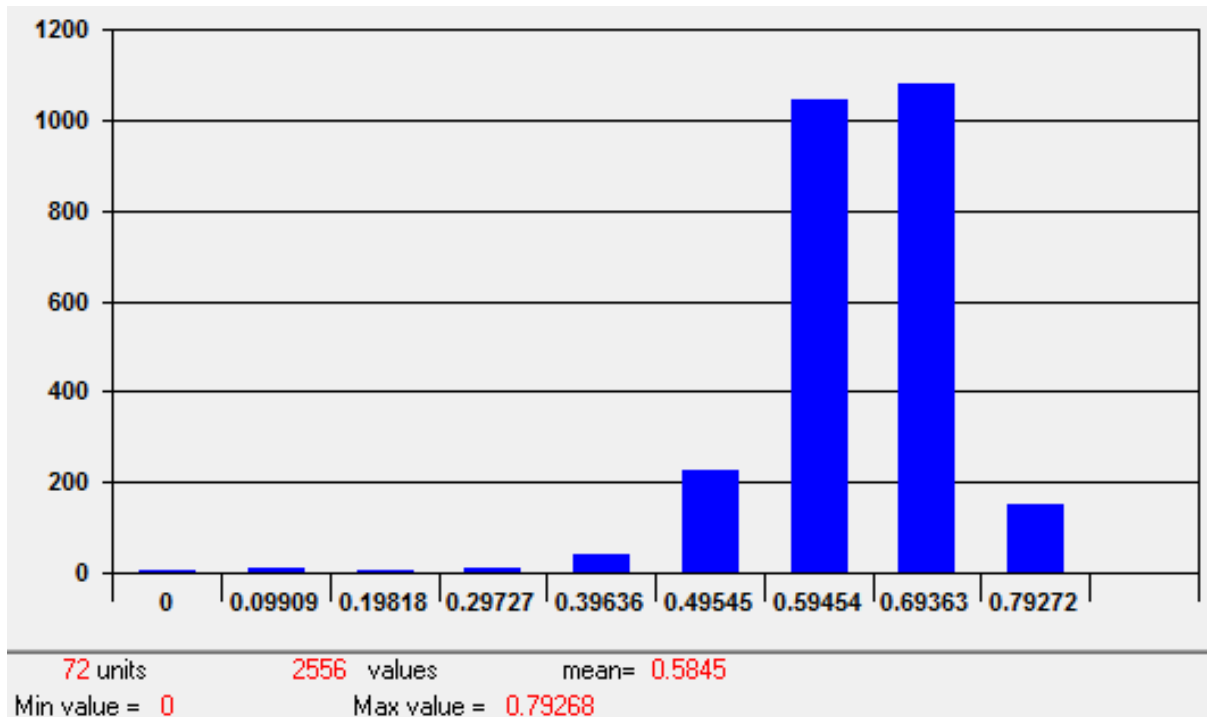
A. Distribución del índice de disimilitud entre pares de variedades de la muestra total estimados con el coeficiente de Jaccard



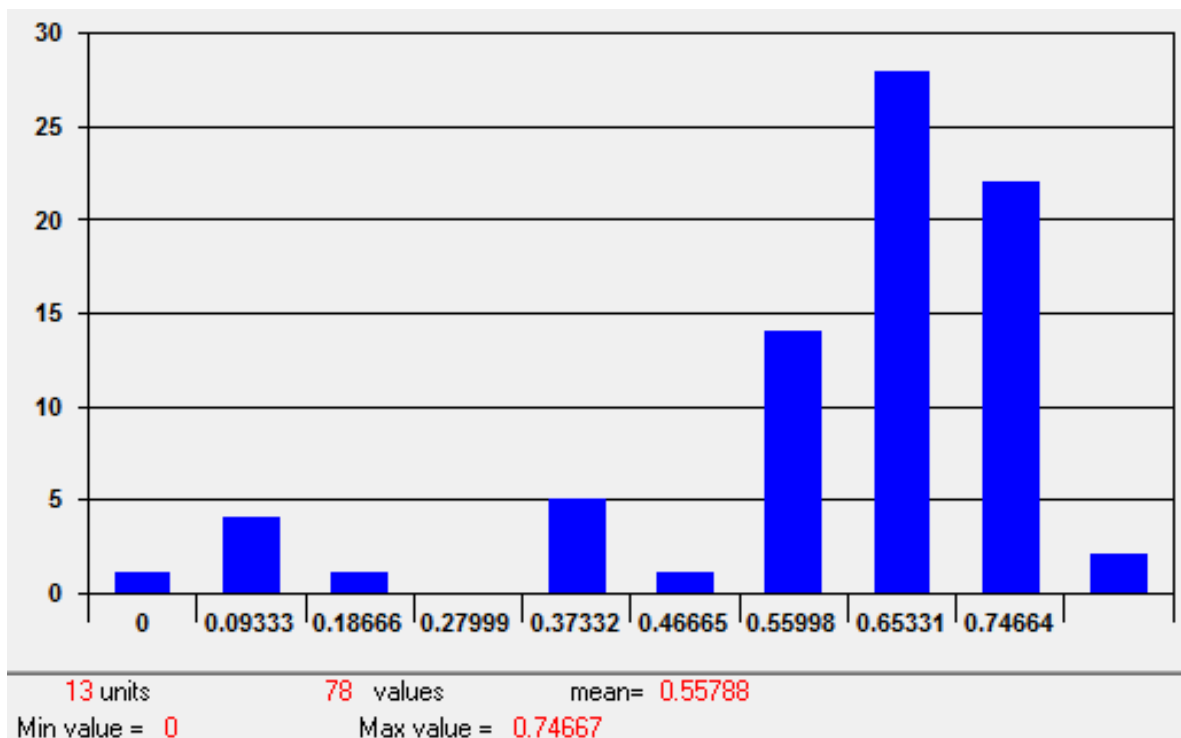
B. Distribución del índice de disimilitud entre pares de variedades de la región Sur



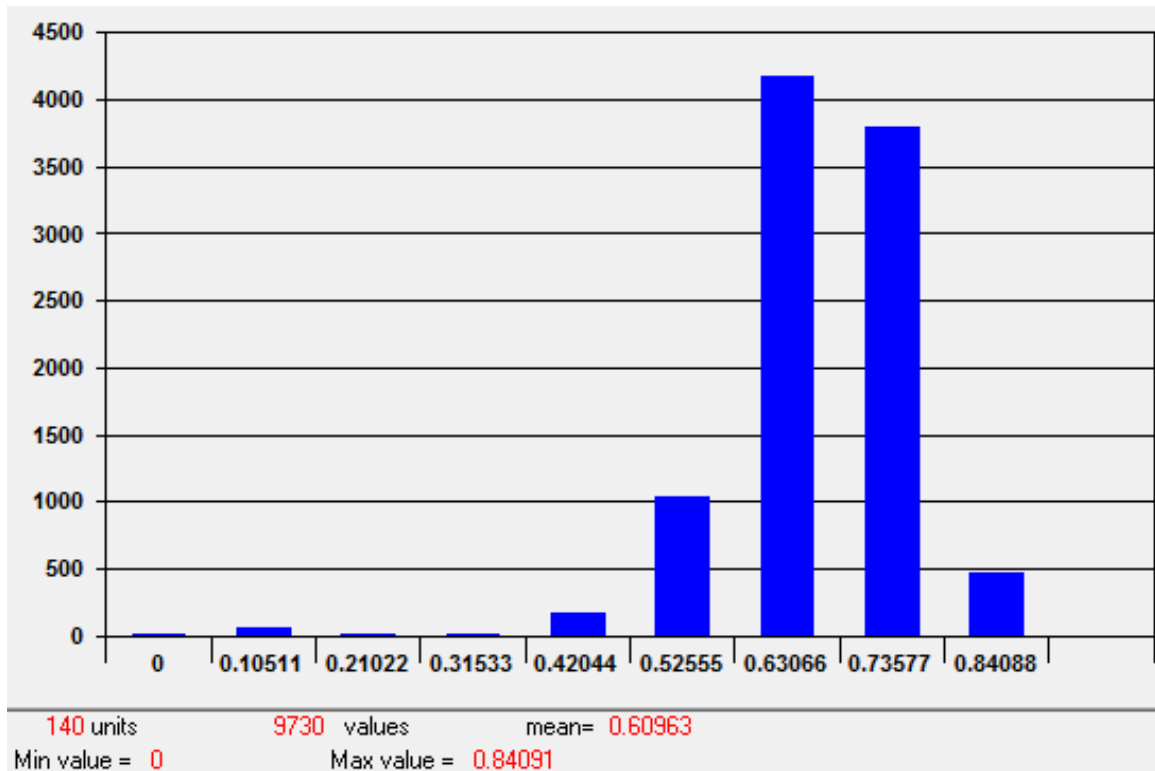
C. Distribución del índice de disimilitud entre pares de variedades de la región Centro



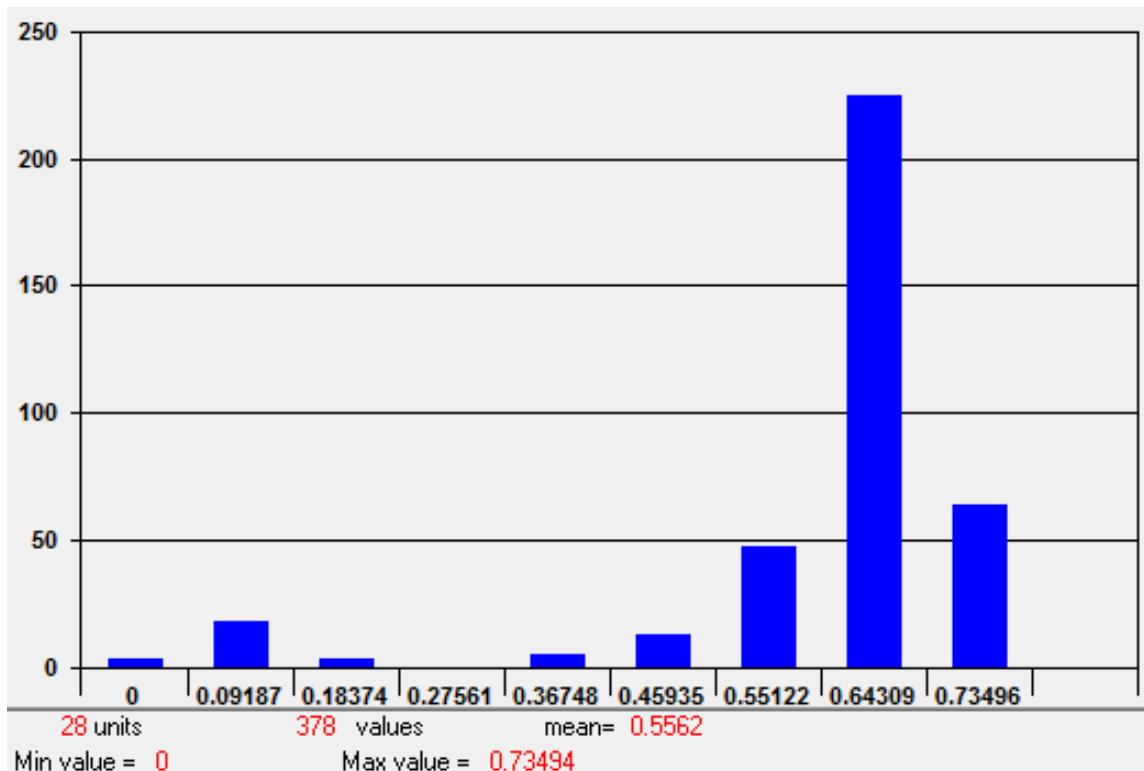
D. Distribución del índice de disimilitud entre pares de variedades de la región Norte



E. Distribución del índice de disimilitud entre pares de variedades nativas



F. Distribución del índice de disimilitud entre pares de variedades mejoradas



Anexo VII

AMOVA de las variedades de papas por regiones, tomada de a pares.

A. Norte vs Sur				
Fuente de Variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados (SC)	Componentes de Varianza	Porcentaje de Variación
Entre Regiones	1	71.221	1.884 Va	7.30
Entre Localidades dentro de las Regiones	3	96.140	0.545 Vb	2.11
Entre Individuos dentro de las Localidades	83	1939.912	23.372 Vc	90.59
Total	87	2107.273	25.801	100

B. Norte vs Centro				
Fuente de Variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados (SC)	Componentes de Varianza	Porcentaje de Variación
Entre Regiones	1	128.650	4.876	20.77
Entre Localidades dentro de las Regiones	4	91.695	0.319 Vb	1.36
Entre Individuos dentro de las Localidades	79	1443.962	18.277	77.86
Total	84	1664.271	23.474	100

C. Centro vs Sur				
Fuente de Variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados (SC)	Componentes de Varianza	Porcentaje de Variación
Entre Regiones	1	137.628	1.338 Va	5.90
Entre Localidades dentro de las Regiones	5	171.343	0.720 Vb	3.18
Entre Individuos dentro de las Localidades	140	2885.560	20.611 Vc	90.92
Total	146	3194.531	22.669	100