

UNIVERSIDAD NACIONAL HERMILIO VALDIZÁN HUÁNUCO
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE AGRONOMIA



**DISTRIBUCIÓN ESPACIAL Y GENÉTICA
POBLACIONAL DE PAPAS “Kurau” (*Solanum
tuberosum* subsp. *andigena*) EN TRES
PROVINCIAS DE LA REGIÓN HUÁNUCO**

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE INGENIERO AGRÓNOMO

BERNARDO SOLÍS, Luz Yaneth

HUÁNUCO - PERÚ

2015

UNIVERSIDAD NACIONAL HERMILIO VALDIZÁN HUÁNUCO
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE AGRONOMÍA



**DISTRIBUCIÓN ESPACIAL Y GENÉTICA
POBLACIONAL DE PAPAS “Kurau” (*Solanum
tuberosum* subsp. *andigena*) EN TRES
PROVINCIAS DE LA REGIÓN HUÁNUCO**

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE INGENIERO AGRÓNOMO

BERNARDO SOLÍS, Luz Yaneth

HUÁNUCO - PERÚ

2015

*A Eulogio, mi
abuelito: por contagiarme
su espíritu perseverante.*

*A Elita, mi madre:
por todo el amor,
dedicación y apoyo
constante.*

*La ciencia es el alma de la prosperidad de las naciones y
la fuente de todo progreso.*

AGRADECIMIENTO

En el Centro Internacional de la Papa:

Al Dr. Stef de Haan, líder del Programa Global de Recurso Genéticos del CIP, por su confianza, apoyo, motivación y gentileza.

A Dra. María Scurrah y Carolina Bastos, por enseñarme el magnífico mundo de la investigación e involucrarme en ello.

A la Dra. Flor Rodríguez, por estar presta a despejar mis dudas con su vasto conocimiento.

Al M.SC. Jorge Núñez, por su calidad humana y paciencia en transmitirme enseñanzas teóricas y prácticas para llevar a cabo esta labor, gran maestro muchas gracias por todo.

Al Blgo. Luis Roca e Ing. Jorge Montalvo, por su cooperación y gran apoyo.

A los Sres. Luciano Fernández, José Rodríguez, Julio Frisancho, Mariela Aponte, María David, Laura, por amistad y compañerismo en el laboratorio. A Griselda Lay, por su apoyo en la revisión de información en la biblioteca.

A Patty Gallo, por su cálida atención y apoyo en trámites documentarios.

En la Universidad Nacional Hermilio Valdizán:

A la Dra. Milka Tello, por alentarme y asesorarme en la ejecución y presentación de la tesis. A cada uno de los catedráticos de mi Universidad por su esmero en impartirme conocimientos los cinco años de mi formación académica profesional.

A Luis, Wily y Judith, por su entusiasmo, compañía y gran apoyo en campo.

En mi familia y amigos:

Las gracias del mundo para mis padres: Elita y Teo por su afán en proporcionarme lo mejor de ellos. A Don José y mi tía Irma, hermanas (os), tíos (as) Alicia gracias infinitas mi querida tía, padrinos Yola y Quinte, primos Jack y su tribu.

A mis amigas (os) Marcia, Ana, Alex, Toni, Nancy, Anasemia, Marina, Addrín; gracias por sumarse a las aventuras y hacer amena la vida universitaria.

A Katy meza, por tu paciencia buena amiga; a Sarita Zúñiga, gracias doña por sus buenos consejos. A todos quienes confiaron en mí en cada momento y me animaron a seguir con lo que había emprendido. Gracias Cristo!!!.

ÍNDICE DE CONTENIDO

ÍNDICE DE TABLAS

ÍNDICE DE FIGURAS

ABREVIATURAS

RESUMEN

ABSTRACT

I.	INTRODUCCIÓN	15
II.	MARCO TEÓRICO	18
	2.1 LA PAPA A TRAVÉS DEL TIEMPO	18
	2.1.1 Clasificación taxonómica de <i>Solanum tuberosum</i> subsp. <i>andigena</i> :	21
	2.1.2 Papas "KURAU"	21
	2.2 DISTRIBUCIÓN ESPACIAL	23
	2.2.1 Sistema de Posicionamiento Global (GPS)	24
	2.2.2 Sistema de Información Geográfica (SIG)	24
	2.2.3 Aplicaciones de SIG	24
	2.3 MARCADORES MOLECULARES	25
	2.3.1 Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR)	26
	2.3.2 Tipos de marcadores moleculares	27
	2.3.3 Marcadores microsatélites	28
	2.3.4 Marcadores microsatélites en el estudio de la papa	28
	2.4 GENÉTICA DE POBLACIONES	31
	2.4.1 Erosión genética	31
	2.4.2 Variación genética	32
	2.4.3 Polimorfismo genético	32
	2.4.4 Distancia genética	33
	2.4.5 Análisis de varianza molecular (AMOVA)	33
	2.5 ANTECEDENTES	34
	2.6 VARIABLES E INDICADORES	35
III.	MATERIALES Y MÉTODOS	36
	3.1 LUGAR DE EJECUCIÓN	36

3.2 EQUIPOS, MATERIALES Y REACTIVOS	36
3.2.1 Equipos y Materiales de Campo	36
3.2.2 Equipos, Materiales y Reactivos de Laboratorio de biología molecular	37
3.2.3 Material Biológico	39
3.2.3 Equipos, materiales de gabinete:	39
3.2.4 Programas Informáticos	40
3.3 CONDUCCIÓN DE LA INVESTIGACIÓN	40
3.3.1 Fase de campo:	40
3.3.1.1 Selección de Zonas de Estudio	40
3.3.1.2 Obtención de Puntos de Referencia Geográfica	41
3.3.2 Fase de laboratorio:	42
3.3.2.1 Extracción de ADN	42
3.3.2.2 Digestión con ARNasa	43
3.3.2.3 Calidad de las Muestras de ADN en geles de agarosa	43
3.3.2.4 Cuantificación de las muestras de ADN	44
3.3.2.5 Dilución de las muestras de ADN	44
3.3.2.6 Amplificación de las regiones microsátélites	44
3.3.2.6.1 Detección de fragmentos amplificados	47
3.3.2.6.2 Identificación de Alelos Microsatélite	48
3.3.3 Fase de gabinete	49
3.3.3.1 Análisis de datos SIG	49
3.3.3.2 Análisis de mapas	49
3.3.3.3 Predicción de zonas de ocurrencia de papas kurau en Huánuco	49
3.3.3.4 Análisis de datos moleculares	50
3.3.3.4.1 Determinación de heterocigosidad, riqueza alélica y haplotipos	50
3.3.3.4.2 Análisis de agrupamiento	51
3.3.3.2.3 Análisis de coordenadas principales (PCoA)	52
3.3.3.4.3 Análisis de Variancia Molecular (AMOVA)	52
3.3.3.4.4 Análisis de estructura genética	54
IV. RESULTADOS	55
4.1 DISTRIBUCIÓN ESPACIAL (SIG)	55
4.1.1 Zonas de estudio	55
4.1.1.1 Provincia de Yarowilca	55

4.1.1.2 Provincia de Huamalíes _____	56
4.1.1.3 Provincia de Ambo _____	56
4.1.2 Mapas de distribución espacial de papas kurau _____	57
4.1.2.1 Mapa de ubicación geo referenciada de la región Huánuco _____	57
4.1.2.2 Mapa de ubicación geo referenciada de cada una de las zonas dentro de las provincias _____	59
4.1.2.3 Rangos de la geo referencia de las zonas de estudio y las provincias ____	59
4.1.2.4 Mapas de distribución espacial de papas kurau dentro de las parcelas _	63
4.1.2.5 Mapa de Predicción de ocurrencia de papas kurau en la Región Huánuco _____	65
4.2 ESTRUCTURA GENÉTICA DE POBLACIONES _____	67
4.2.1 Caracterización mediante marcadores microsatélites _____	67
4.2.1.1 Registro de número de alelos por marcador _____	67
4.2.2 Riqueza alélica _____	70
4.2.2.1 Riqueza alélica por provincia _____	70
4.2.2.2 Riqueza alélica por zonas _____	70
4.2.3 Tipos de alelos encontrados _____	72
4.2.3.1 Alelos frecuentes, moderadamente frecuentes, escasos y raros _____	72
4.2.3.2 Alelos fijos y exclusivos _____	72
4.2.4 Heterocigosidad _____	73
4.2.4.1 Heterocigosidad por provincias y zonas _____	74
4.2.5 Haplotipos _____	74
4.2.6 Análisis de varianza molecular (AMOVA) _____	75
4.2.6.1 Agrupamiento por provincias y zonas _____	75
4.2.7 Análisis de agrupamiento _____	76
4.2.7.1 Dendrograma de zonas geográficas _____	77
4.2.7.2 Dendrograma de provincias geográficas _____	77
4.2.8 Análisis de Coordenadas Principales _____	77
4.2.9 Análisis de Estructura genética _____	80
4.3 Descripción de ecotipos encontrados en las tres provincias _____	82
4.3.1 Provincia de Yarowilca: _____	82
4.3.2 Provincia de Huamalíes: _____	82
4.3.3 Provincia de Ambo: _____	82

V. DISCUSIÓN	84
5.1 DISTRIBUCIÓN ESPACIAL	84
5.1.1 Distanciamiento entre provincias y zonas	84
5.1.2 Distribución de genotipos en las provincias	84
5.1.3 Distribución de genotipos en las zonas	85
5.1.4 Distribución de genotipos dentro de las parcelas	86
5.1.5 Predicción de ocurrencia de papas kurau en la Región Huánuco	86
5.2 ESTRUCTURA GENÉTICA DE POBLACIONES	86
5.2.1 Caracterización mediante 23 marcadores microsatélite	86
5.2.2 Riqueza alélica	87
5.2.3 Heterocigosidad	88
5.2.4 Haplotipos	89
5.2.5 Análisis de Variancia Molecular (AMOVA)	90
5.2.6 Análisis de agrupamiento	91
5.2.7 Análisis de coordenadas principales y estructura genética de las poblaciones	92
VI. CONCLUSIONES	93
VII. RECOMENDACIONES	94
VIII. LITERATURA CITADA	95
IX. ANEXOS	106

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Diferencias morfológicas y fisiológicas.....	20
Tabla 2.	Características relevantes de los principales marcadores moleculares	27
Tabla 3.	Zonas con presencia de papas “kurau”.....	36
Tabla 4.	Protocolo I para la preparación de Master Mix.....	45
Tabla 5.	Protocolo II para la preparación de Master Mix.....	45
Tabla 6.	Protocolo de amplificación de PCR utilizado.....	46
Tabla 7.	Marcadores microsatélites utilizados del set de PGI.....	46
Tabla 8.	Componentes que definen un AMOVA.....	54
Tabla 9.	Ecotipos predominantes de papa kurau y cultivo asociado en la provincia de Yarowilca	55
Tabla 10.	Ecotipos predominantes de papa kurau y cultivo asociado en la provincia de Huamalíes	56
Tabla 11.	Ecotipos predominantes de papa kurau y cultivo asociado en la provincia de Ambo	57
Tabla 12.	Rango de Latitud y Longitud de ocurrencia de papas kurau por provincia.....	63
Tabla 13.	Número y tamaño de los alelos amplificados por microsatélite... ..	68
Tabla 14.	Total de alelos encontrados.....	69
Tabla 15.	Riqueza alélica por provincia geográfica de procedencia.....	71
Tabla 16.	Riqueza alélica para las seis zonas estudiadas.....	72
Tabla 17.	Tipo de alelos encontrados por provincias y zonas.....	73
Tabla 18.	Alelos fijos y exclusivos por departamento, provincias y zonas... ..	73
Tabla 19.	Análisis de varianza molecular de provincias y zonas.....	76
Tabla 20.	Análisis de varianza molecular de las Zona.....	76
Tabla 21.	Resumen de las zonas de estudio y las provincia.....	113
Tabla 22.	Heterocigosidad esperada, promedios, mínimos y máximos por marcador microsatélite para provincias y zonas.....	114
Tabla 23.	Análisis de varianza molecular para Huamalíes y Yarowilca.....	114
Tabla 24.	Análisis de varianza molecular para Yarowilca y Ambo.....	114
Tabla 25.	Análisis de varianza molecular para Huamalíes y Ambo.....	114

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Antecedentes evolutivos de la papa (Hawkes, 1994).....	20
Figura 2.	Mapa de georeferencia de las zonas de estudio de la Región Huánuco.....	58
Figura 3.	Ubicación geo referenciada de las provincia de Yarowilca y las zonas de estudio.....	60
Figura 4.	Ubicación geo referenciada de las provincia de Huamalíes y las zonas de estudio.....	61
Figura 5.	Ubicación geo referenciada de las provincia de Ambo y las zonas de colecta.....	62
Figura 6.	Resumen de altitudes de las zonas en estudio.....	63
Figura 7.	Mapa de distribución total de papas kurau dentro de una parcela en Yarowilca.....	64
Figura 8.	Mapa de distribución total de papas kurau dentro de una parcela en Huamalíes.....	64
Figura 9.	Mapa de distribución total de papas kurau dentro de una parcela en Ambo.....	65
Figura 10.	Mapa de predicción de provincias de ocurrencia de papas kurau en la Región Huánuco.....	66
Figura 11.	Patrón del marcador microsatélite STG0016 amplificado en Licor con IRD 700, las aspas señalan tamaño de alelo.....	67
Figura 12.	Patrón de alelos del marcador microsatélite STG0016 amplificado en Li-cor, con IRD 800, se observa el polimorfismo de las muestras.....	69
Figura 13.	Patrón de alelos del marcador microsatélite STI0003 amplificado en Li-cor, con IRD 700; los alelos se muestran nítidamente siendo fáciles de evaluar.....	69
Figura 14.	Promedio, Mínimos y Máximos de Heterocigosidad por provincias y zonas.....	74
Figura 15.	Haplotipos y formación de estructura de poblaciones.....	75
Figura 16.	Dendrograma de relación genética entre las zonas.....	78
Figura 17.	Dendrograma del grupo kurau por las provincias geográficas.....	79
Figura 18.	Análisis de Coordenadas Principales (PCoA).....	80
Figura 19.	Estructura genética asumiendo que K=3.....	81
Figura 20.	Estructura genética asumiendo que K=6.....	81
Figura 21.	Electroforesis en geles de agarosa de muestras para calidad y cuantificación de ADN. Muestras del 35-68 (Obas	109

	- Yarowilca) teniendo como controles a <i>S. tuberosum</i> en diferentes cantidades 100, 200 y 400ul de ADN.....	
Figura 22.	Electroforesis en geles de agarosa de muestras para calidad y cuantificación de ADN. Muestras del 445 al 461 (Llata-Huamalíes) teniendo como controles a <i>S. tuberosum</i> en diferentes cantidades 100, 200 y 400ul de ADN.....	109
Figura 23.	Software Gen5 y equipo Epoch para cuantificar alelos microsátelites.....	110
Figura 24.	Patrón de bandas obtenidas luego de amplificar con el par de iniciador S194.....	110
Figura 25.	Patrón de bandas obtenidas luego de amplificar con el par de iniciadores S210.....	110
Figura 26.	Ecotipo coleteo (sup. Izq.) uchcumia (medio izq.) Shawinto o juito (inf. Izq y der.) de la provincia de Yarowilca.....	111
Figura 27.	Ecotipo oque kurau o Martin kurao de San Pedro del Maraón – Singa (Huamalíes).....	111
Figura 28.	Ecotipo puca kurau o kurao rojo de Llata (Huamalíes).....	112
Figura 29.	Ecotipo kurao ambarina (A), habas kurao (B), Shojti (C) y (D) kurao blanco de Singa (Huamalíes).....	112
Figura 30.	Ecotipo puca kurau (Muestras ADN) (A), kurao (B), Sogochacuan (C) (Ambo).....	113
Figura 31.	Dendrograma del grupo Kurau procedentes de Huánuco con las otras especies de papas cultivadas y un grupo control (Silvestres).....	115

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AFLP	Polimorfismo en la longitud de los fragmentos amplificados (Amplified fragment length polymorphism)
AMOVA	Análisis de variación molecular
ARN	Ácido ribonucleico
CIP	Centro Internacional de la Papa
CPM	Centro Poblado Menor
CTAB	Bromuro de cetil-trimetil-amonio (Cetil-trimetil-amonium bromide)
EDTA	Acido etilen-diamino-tetra-acético (Etilen diamine tetra-acetic acid)
GPS	Sistema de posicionamiento global
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase chain reaction)
PCoA	Análisis de coordenadas principales
PGI	Identificación genética de la papa
RAPD	Polimorfismo en el ADN amplificado aleatoriamente (Random amplified polymorphism DNA)
RFLP	Polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción
SIG	Sistema de información geográfica
SNP	Polimorfismo de nucleótido simple
SSR	Secuencias simples repetidas (Simple sequence repeat)
TBE	Tris-borato-EDTA
UPGMA	Método de agrupamiento con media aritmética no ponderada (Unweighted pair group method with arithmetic mean)

RESUMEN

La papa posee gran importancia como alimento mundial; sin embargo, no todas las especies fueron ampliamente estudiadas; este es el caso de las papas semi-silvestres denominadas kurau, que pueden ser fuentes de genes interesantes. El presente trabajo de investigación se realizó con muestras biológicas de tres provincias de la Región Huánuco, en los laboratorios del Centro Internacional de la Papa con la finalidad de determinar la distribución espacial y la estructura genética de poblaciones de papas kurau (*Solanum tuberosum* subsp. *andigena*), mediante georreferenciación y marcadores moleculares microsatélites (SSR). El estudio de distribución espacial se llevó a cabo registrando los tres puntos georeferenciales: latitud, longitud y altitud en las zonas de las provincias Yarowilca, Huamalíes y Ambo respectivamente. Para la determinación de la estructura genética, se colectó folíolos en 2 zonas de cada provincia, haciendo un total de 688 muestras; a partir de éstos se extrajo ADN genómico. Se utilizaron 23 SSR del set de Identificación Genética de Papa (GPI) (Ghislain *et al.*, 2009). Los resultados mostraron que las zonas de ocurrencia de papas kurau se encuentran entre 2599 y 3868 msnm, asociados mayormente a maíz y una minoría con habas y otros cultivos. De acuerdo al mapa de predicción, se pueden hallar papas kurau en 7 provincias de la Región Huánuco. Los resultados moleculares mostraron alta heterocigosidad (0.71), 188 alelos totales encontrados, 47 alelos exclusivos, 100 haplotipos en Yarowilca, 100 para Huamalíes y 10 para Ambo. Amova determinó alta variación genética dentro de las zonas (56.97%) $F_{st} = 0.43$. El índice de Jaccard concretó 2 grupos: Ambo (0.025 de disimilaridad) muy homogéneo y Yarowilca – Huamalíes (0.552, 0.528) heterogéneos. Las poblaciones muestreadas están estructuradas en dos grupos.

Palabras claves: Papa kurau, distribución espacial, geo referenciación, marcadores moleculares microsatélites, estructura genética, AMOVA.

ABSTRACT

The potato has great importance as a global food; however, not all species were widely studied; this is the case of semi – wild potato called Kurau, which can be sources of genes of interest. This research was conducted with biological samples from three provinces of Huanuco region, in the laboratories of the International Potato Center in order to determine the spatial distribution and genetic structure of populations Kurau potato (*Solanum tuberosum subsp. andigena*), using georeferencing and microsatellite molecular markers (SSR). The study of spatial distribution was carried out by recording the three georeferenced points: latitude, longitude and altitude in areas of the provinces Yarowilca, Huamalíes and Ambo respectively. To determine the genetic structure, has collected in two zones leaflets each province, making a total of 688 samples; from these extracted genomic DNA. 23 SSR of kit Genetic Identification of Potato (Ghislain *et al.*, 2009) were used. The results showed that the areas of occurrence of Kurau potatoes are between 2599 and 3868 m, mostly associated with a minority with corn and beans and other crops. According to the prediction map, you can be found potatoes Kurau in 7 provinces of Huanuco region. The results showed high molecular heterozygosity (0.71) alleles found 188 total, 47 exclusive alleles, haplotypes in Yarowilca 100, 100 for Huamalíes and 10 for Ambo. AMOVA found high genetic variation within regions (56.97%) $F_{st} = 0.43$. Jaccard index finalized two groups: Ambo (0.025 dissimilarity) very homogeneous and Yarowilca - Huamalíes (0.552, 0.528) heterogeneous. The sampled populations are structured into two groups.

Keywords: Papa Kurau, spatial distribution, geo referencing, microsatellite molecular markers, genetic structure, AMOVA.

I. INTRODUCCIÓN

La demanda alimenticia de la población mundial se incrementa año tras año y a ello se suman los procesos de desertificación, empobrecimiento de suelos, la depredación excesiva e indiscriminada de recursos vegetales, destrucción de hábitats y comunidades naturales que contribuyen a la erosión genética de la diversidad existente (PROCISUR, 1995).

Por las razones expuestas los centros de investigación buscan recursos genéticos con objeto de asegurar la alimentación; la papa (*Solanum tuberosum* L.), es uno de éstos; éste cultivo ocupa el tercer lugar en importancia de alimentación mundial después del arroz y del trigo (CIP, 2011).

La papa de los Andes Sudamericanos, tiene como centro de origen primario el Perú y consta de ocho especies cultivadas: *Solanum stenotomum*, *S. gonyocalix*, *S. phureja*, *S. ajanhuiri*, *S. juzepczukii*, *S. chaucha*, *S. tuberosum* (con dos subespecies *S. tuberosum* subsp. *tuberosum* y *S. tuberosum* subsp. *andigena*) y *S. curtilobum*; a la que se suman más de 200 especies silvestres (Egúsquiza *et al.*, 2009).

En el mejoramiento genético del cultivo de la papa, sólo se ha utilizado dos subespecies: *S. tuberosum, tuberosum* y *andigena*, a partir de las cuales se han desarrollado la mayoría de las variedades comerciales conocidas. Las otras siete especies cultivadas son menos estudiadas y corren riesgo de erosión (Álvarez, 2001).

Los cultivares tradicionales y/o especies filogenéticas relacionadas 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; e *in situ*, en sus ecosistemas y hábitats naturales (Ashkenazi *et al.*, 2001).

En el Perú, la papa se cultiva en 19 de las 24 regiones desde el nivel del mar hasta los 4200 metros de altura. Este cultivo constituye la base de la alimentación del poblador andino (Trujillo, 2001; Edward, 2010). En el Centro Internacional de la Papa (CIP), con sede en el Perú, se mantiene el banco de germoplasma de la papa más grande del mundo (ONU, 2008; Paredes, 2010).

Una de las regiones que presenta gran diversidad de papas entre variedades nativas y especies silvestres es la Región Huánuco. Dentro de las cuales se encuentran las papas “kurau o kurao” (*Solanum tuberosum* subsp. *andigena*) denominación utilizada en la Región. Los únicos estudios referentes a este tipo de papas fueron del Dr. Carlos Ochoa (2001) y del Ing. Juan Seminario (2004), quienes sólo las consideraron como malezas que crecen dentro de cultivos de maíz y que sus tubérculos son comestibles. Se les atribuyen características importantes como resistencia a *Phytophthora infestans* y polillas, tolerancia a heladas y otros atributos como actividades desinflamatorias (comunicación personal con agricultores).

La investigación se realizó tomando en cuenta los siguientes objetivos:

- ✓ Georeferenciar en 12 zonas de tres provincias de la Región Huánuco.
- ✓ Modelar zonas de ocurrencia de papas “kurau” en la Región Huánuco.
- ✓ Evaluar molecularmente, a través del análisis de marcadores microsatélites, poblaciones de papas “kurau” de 6 zonas de 3 provincias de la Región Huánuco.
- ✓ Determinar la estructura genética de las poblaciones de papas “kurau” de 6 zonas de 3 provincias de la Región Huánuco.

Estos propósitos se determinaron mediante el uso del Sistema de Información Geográfica (SIG) tomando como datos la latitud, longitud y altitud donde ocurren con frecuencia (condiciones para desarrollarse eficientemente) las poblaciones de papas kurau. El modelamiento de zonas de ocurrencia de papas kurau se dan a partir de estos datos SIG.

Para determinar la estructura genética se usó los marcadores microsatélites (SSR), por ser más informativos para estudios genético poblacionales, por su característica genética codominante, su alto grado de polimorfismo, su fácil reproducibilidad y por la existencia de protocolos estandarizados por el Centro Internacional de la Papa (CIP, 1997; Ferreyra y Gratapaglia, 1998; Ghislain *et al.*, 2001). También se determinó el grado de disimilaridad de poblaciones entre y dentro de parcelas, zonas y provincias. Se tuvo 720 genotipos colectados de papas kurau procedentes de tres provincias de la Región Huánuco: Yarowilca, Huamalíes y Ambo.

Por lo tanto, es necesario un estudio sobre las papas “kurau”. En primera instancia para conocer dónde ocurre este tipo de papas y en segundo lugar para dilucidar cuál es la estructura genética de estas poblaciones. Este conocimiento base, sumado a otros estudios sobre características morfológicas, nutricionales, resistencia o tolerancia a factores bióticos y abióticos, determinará la utilidad de las papas “kurau” en programas de mejoramiento genético.

II. MARCO TEÓRICO

2.1 LA PAPA A TRAVÉS DEL TIEMPO

La historia de la papa comienza con las especies silvestres que son muy similares a las papas cultivadas de la actualidad. Las papas silvestres están ampliamente distribuidas en las Américas desde el sudoeste de los Estados Unidos hasta la parte central de Argentina y sur de Chile (Hawkes, 1990). Se encuentran desde el nivel del mar hasta más de 4 000 metros de altitud (Huamán, 1986).

La papa se cultiva desde hace 8000 años y su lugar de origen ha sido muy discutido. Actualmente hay certeza que proviene de la región andina, principalmente de Perú (INIA y FAO, 2008) y Bolivia (Hawkes, 1990, Spooner *et al.*, 2005), siendo la región del Lago Titicaca el centro de origen principal debido a la existencia de un gran número de especies y variedades cultivadas (Hawkes, 1962).

El segundo conjunto de poblaciones criollas se desarrollaron en la isla de Chiloé, las islas adyacentes del archipiélago de los Chonos, y las zonas continentales de las tierras bajas del sur de Chile (Roca *et al.*, 2008). Estas poblaciones chilenas probablemente surgieron de poblaciones andinas que se sometieron a hibridación con las especies silvestres (Spooner *et al.* 2005).

Este cultivo nativo consta de ocho especies cultivadas: *S. stenotomum* (2x), *S. gonyocalix* (2x), *S. phureja* (2x), *S. ajanhuiri* (2x), *S. juzepczukii* (3x), *S. chaucha* (3x), *S. tuberosum* (4x) (con dos subespecies *S. tuberosum* subsp. *tuberosum* y *S. tuberosum* subsp. *andigena*) y *S. curtilobum* (5x). Al germoplasma primario se suman 207 especies silvestres (Hawkes, 1990). Sin embargo, Spooner *et al.* (2007) clasifica a la papa cultivada en 4 especies: *S. ajanhuiri*, *S. juzepczukii*, *S. curtilobum* y *S. tuberosum*, esta última con dos grupos de cultivares (grupo Andigena y grupo Chilotanum).

En las diploides, se consideran 4 especies de papa cultivada. Una de ellas es *S. stenotomum*, considerada la más primitiva de todas las formas cultivadas debido a sus características se asemejan a las papas silvestres. *S. goniocalyx* es un derivado de *S. stenotomum* y apareció como una variación a éste (Estrada, 2000). *S. phureja* se considera que deriva de *S. stenotomum* por participación de mutaciones y selección.

S. ajanhuiri que es un híbrido natural entre *S. stenotomum* y una especie silvestre (2x) resistente a la helada (posiblemente *S. magistacrolobum*). Las dos especies triploides son considerados híbridos naturales. Se ha sugerido que *S. chaucha* es un híbrido que resultó de cruces entre *S. andigena* y *S. stenotomum*.

Según Hawkes (1962), *S. juzepczukii* es un híbrido derivado del cruce entre *S. stenotomum* y *S. acaule* (una especie silvestre tetraploide y altamente resistente a las heladas). *S. curtilobum*, especie cultivada pentaploide, es un híbrido natural que proviene de la unión de *S. juzepczukii* con *S. andigena*. (Hawkes, 1962; Schmiediche *et al.*, 1982).

De todas las especies cultivadas solamente *S. tuberosum* ssp. *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 (Contreras, 2008; Huamán, 1986).

En el siglo XVI, los colonizadores españoles introducen la papa en Europa. A partir de ese momento el cultivo de papa se expandió y en la actualidad es un alimento que se consume en todo el mundo (Borda, 2008).

De las especies cultivadas, existe controversia entre las dos subespecies *tuberosum* y *andigena*. Las diferencias morfológicas y fisiológicas son las siguientes según Contreras, 2008:

Tabla 1. Diferencias morfológicas y fisiológicas.

subsp andigena	subsp tuberosum
✓ Tuberización en fotoperiodo corto	✓ Tuberización en fotoperiodo corto
✓ Periodo vegetativo de 5-7 meses	✓ Periodo vegetativo de 3-4 meses
✓ Floración abundante por varios meses	✓ Floración escasa y por corto tiempo
✓ Periodo largo de receso	✓ Periodo corto de receso
✓ Tubérculos de forma defectuosa	✓ Tubérculos de muy buena forma
✓ Ojos ligeramente profundos	✓ Ojos superficiales
✓ Buena calidad para almacenaje	✓ Baja calidad para almacenaje
✓ Numerosos tubérculos de tamaño mediano	✓ Tubérculos de tamaño grande y menos pequeños
✓ Alta disección de la hoja	✓ Baja disección de la hoja

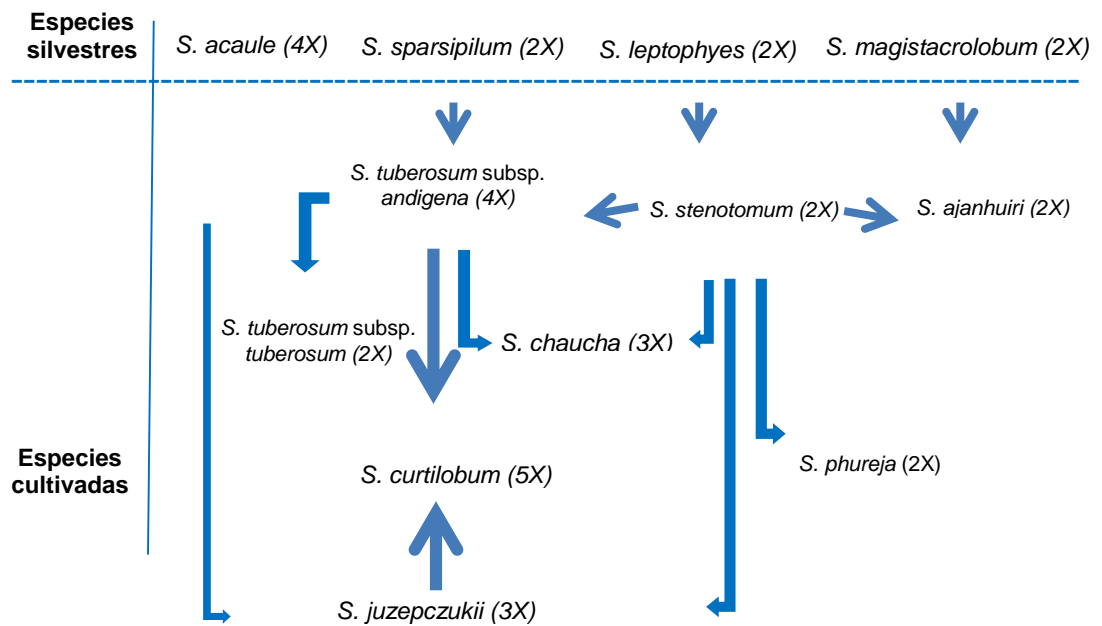


Figura 1. Antecedentes evolutivos de la papa (Hawkes, 1994).

El presente estudio utilizará la clasificación taxonómica propuesta por Hawkes (1990).

2.1.1 Clasificación taxonómica de *Solanum tuberosum* subsp. *andigena*:

Reino	:	Vegetal
División	:	Fanerógamas
Subdivisión	:	Angiospermas
Clase	:	Dicotiledóneas
Subclase	:	Simpétalas
Sección	:	Anisocárpeas
Orden	:	Tubifloríneas
Familia	:	Solanaceae
Género	:	<i>Solanum</i>
Sección	:	<i>Petota</i>
Subsección	:	<i>Potatoe</i>
Serie	:	XVI <i>Tuberosa</i> (Hawkes)
Especie	:	<i>S. tuberosum</i>
Subespecie	:	<i>Andigena</i>

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. 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).

2.1.2 Papas “KURAU”

El grupo de papas kurau fue considerada como *S. sparsipilum* (Ochoa, 1999), una de las especies ancestrales de la papa cultivada *S. tuberosum* con sus subespecies *tuberosum* y *andigena* (Hawkes, 1956), posteriormente según evidencias experimentales Cribb y Hawkes (1986) propusieron, que el origen de la subsp. *andigena* se produjo por cruzamiento natural de *S. stenotomum*

($2n=24$) y la especie silvestre *S. sparsipilum*, con doblaje de su número cromosómico ($2n=48$).

La especie *S. sparsipilum* guarda relación con *S. ambosinum*; conocidos localmente como Auquillo papa (papa de los abuelos), además presentan estolones largos y habitan en lugares de clima templado entre 2200 m y 2900 m; así mismo, también se relaciona con *S. marinasense*, que raras veces viven en márgenes de cultivos de maíz o papa desde los 2000m hasta los 3000m (Ochoa, 1999) en contraste a todas las anteriores el grupo semi-silvestre araq o kurau presenta tubérculos comestibles.

S. sparsipilum también tiene afinidad con *S. bukasovii* cuya distribución geográfica se extiende desde las jalcas de los departamentos de Ancash y Huánuco, al norte; las punas y los valles interandinos de los departamentos de Pasco, Junín, Huánuco y Huancavelica, al centro; hasta Ayacucho, Apurímac, Cusco, Arequipa, Moquegua y Puno al Sur, con posible extensión al noroeste de Bolivia.

En nuestro país se distribuyen por el norte, centro y sur tomando diferentes nombres. En Cajamarca son llamadas “Kurao” (Seminario, 2004). En la región Huánuco adoptan diferentes nombres dependiendo de la zona: “kurau”, “trajinero”, “papas de carnaval”, mancalucso, shaushiray, yana gara, entre otros (Ambo), “shiwanikey” (Yauran – Margos), “papa de los abuelos”, “papa de los gentiles”, “papa de los incas”, “tasca” (Singa – Huamalies). En San Marcos, Ancash, son denominadas “koro” o “korokoro”. En la Región Junín se las conoce como “papa curao” (de Haan *et al.*, 2006). En el sur del país, Cuzco, Ayacucho, Apurímac, se las conoce como “araqa papa o araq” (Ochoa, 2001, Comunicación personal Alberto Salas).

Se puede encontrar papas araq o kurau en territorios de Venezuela (de Haan *et al.*, 2006), Ecuador, Perú y Bolivia, mas no en los países restantes de Sudamérica (comunicación personal de Ing. Alberto Salas).

Las papas kurau son consideradas como maleza; crecen constantemente dentro de maizales (Ochoa, 2001), huertos u otros cultivos como habas, avena y reciben atenciones indirectas del agricultor (Seminario, 2004); ya que al momento de aporcar el cultivo con el que se encuentra asociado también se aporca las papas kurau. Genéricamente la llaman araq papa; atokk papa o k'ita papa (de Haan, 2006).

Se colectan en pequeñas cantidades cuando inician los carnavales (febrero, marzo, abril) y en mayor cantidad cuando se prepara el terreno (arado) para la nueva siembra del cultivo principal (agosto) son las papas primerizas.

Las papas “kurau” presentan tallos robustos, verdes o con algunas pigmentaciones a lo largo del tallo de acuerdo a las variantes, hojas verdes grandes, oscuras y gruesas con pilosidades, flores moradas o blancas según el ecotipo. Las bayas en algunos casos tienen formas raras forma de perro “allgu”, que son utilizados por los niños para jugar (comunicación personal de Gonzalo Alarcón, Agricultor de Huamalíes - Huánuco).

La denominación “kurau o kurao”, se debe a que autocontrarrestan los daños causados por plagas y factores climatológicos, es decir se curan a sí mismas (comunicación personal con Abraham Trinidad agricultores de Yarowilca).

2.2 DISTRIBUCIÓN ESPACIAL

En los cultivos la distribución geográfica nos dicen mucho del tipo de selección humana para ambientes específicos así como la historia del desarrollo del cultivo en distintas localidades.

Según Hodgkin (1995) con la información de la distribución espacial se pueden predecir zonas promisorias similares a las que fueron alteradas por cambios climáticos y seguir cultivando diversos productos adaptados a los parámetros de altitud, latitud, longitud y clima.

2.2.1 Sistema de Posicionamiento Global (GPS)

Es un sistema de radionavegación basado en la emisión de señales desde una constelación de 24 satélites. Se encuentra operativo desde 1995, fue diseñado con fines militares y luego su acceso fue abierto al público. Permite calcular con precisión la posición tridimensional y el tiempo (Molina, 2003) de cualquier objeto. La constelación de satélites se ha diseñado de modo que en cualquier instante y para cualquier zona del planeta exista una línea de vista de al menos 4 satélites.

Existen interferencias o bloqueos de las señales por edificios, montañas, cañones, arboles de gran tamaño. Que llevan a una desconfianza de la precisión del equipo (GPS). Sin embargo, existen sistemas que integran los receptores GPS con sensores magnéticos, inerciales que aumentan su fiabilidad (Molina, 2003).

2.2.2 Sistema de Información Geográfica (SIG)

El Sistema de Información Geográfica (SIG) es un programa informático diseñado para recopilar, administrar, analizar y mostrar datos espacialmente referenciados (FAO, 1988). En la investigación y el desarrollo de papa se puede utilizar el GIS para encontrar sitios de diversificación espacial y temporal de la papa (Khurana *et al.*, 2003; Llacsá y Medina, 2007).

Llacsá y Medina (2007) mencionan que con este sistema se generan mapas de distribución potencial, es decir, áreas en donde de acuerdo con sus requerimientos ambientales podrían eventualmente encontrarse determinadas poblaciones de papas.

Gilles *et al.* (2008) mencionan que con ello se puede predecir cuál será la situación futura de estas poblaciones debido a que se manipulan parámetros de altitudes, temperaturas, precipitaciones y humedad.

2.2.3 Aplicaciones de SIG

SIG puede ser empleado en mapeo de localización, mapeo de cantidades, mapeo de densidades, también en mapeo y monitoreo del cambio. El primero

permite la creación de mapas a través de cartografía automatizada, captura de datos y herramientas de análisis de topografía, el segundo es utilizado para encontrar lugares que cumplen con sus criterios y tomar medidas, o para ver las relaciones entre las partes (Escobar *et al.*, 2009).

Esto proporciona un nivel adicional de información más allá de simplemente en un mapa la ubicación de características. El tercero permite medir el número de funciones utilizando una unidad de superficie uniforme, como hectáreas o kilómetros cuadrados, por lo que se puede ver claramente la distribución.

Con el mapeo y monitoreo se pueden delinear los cambios en un área de anticipar las condiciones futuras, decidir sobre un curso de acción, o para evaluar los resultados de una acción o políticas y puede ser usado para averiguar lo que está ocurriendo dentro de una distancia establecida de una característica (Escobar *et al.*, 2009).

2.3 MARCADORES MOLECULARES

Los marcadores moleculares son fragmentos de ADN, genes o proteínas polimórficos que permiten distinguir entre individuos, familias, poblaciones o especies (Cruz, 2003).

Los marcadores moleculares facilitan la construcción de mapas genéticos, debido al alto nivel de polimorfismo, son neutros con relación a los efectos fenotípicos, efecto epistático o pleiotrópico mínimo o nulo, contienen mayor información genética por locus que los marcadores morfológicos (dominantes o recesivos), y pueden utilizarse en cualquier fase de desarrollo de la planta (Azofeifa, 2006, Martínez, 2013; Ferreyra y Gratapaglia, 1998).

Los marcadores se categorizan de acuerdo ha: nivel de polimorfismo, grado de estabilidad ambiental, número de loci, bases moleculares del

polimorfismo, practicidad y costos, por lo que se elegirá el adecuado dependiendo del objetivo de estudio y presupuestos (Karp y Edwards, 1995).

Los mejores marcadores moleculares tienen que ser polimórficos, es decir varios alelos diferenciables por locus, tener alta heredabilidad, la influencia ambiental debe de ser nula y no deben de interaccionar con el ambiente. También deben de ser reproducibles; de herencia simple, de preferencia con alelos codominantes, sin epistasis. Deben de ser selectivamente neutros, estar bien distribuidos por todo el genoma. Sobre todo deben ser fáciles de registrar y analizar; no expuestos a errores metodológicos; y económicos (Sevilla y Holle, 2004).

2.3.1 Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR)

Es una técnica para copiar (amplificar) fragmentos específicos de ADN a partir de cantidades mínimas de ADN inicial; constituye una revolución tecnológica en el análisis genómico, ya que permite la amplificación de fragmentos enteros específicos de DNA (Saiki, 1988).

Consta de 3 pasos: desnaturalización completa de patrón de ADN (separación de hebras) a 94° C, hibridación (unión de los iniciadores al ADN molde) entre 45° C y 65° C, y por ultimo extensión (incorporación de nucleótidos complementarios por acción de la enzima polimerasa) a 72° C. Este ciclo se repite en promedio 30 veces produciendo una amplificación exponencial del fragmento (Mullis, 1990; Pérez, 2013).

Los componentes para realizar la PCR son: buffer de PCR, desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTPs), iniciador “sentido”, iniciador “anti-sentido”, ion Magnesio, *Taq* polimerasa y ADN molde (Pérez, 2013).

Esta técnica es una herramienta muy importante en biología molecular. Sus aplicaciones van desde estudios sobre genética de poblaciones, evolución molecular y genómica hasta la medicina forense (Espinoza, 2007).

Todos los marcadores moleculares se basan en dos técnicas básicas: las enzimas de restricción y la reacción en cadena de la polimerasa (Ferreyra y Gratapaglia, 1998).

2.3.2 Tipos de marcadores moleculares

Khurana *et al.*, (2003) señalan que los marcadores moleculares se basan fundamentalmente en el análisis de las diferencias en las secuencias de ADN de los individuos. Las técnicas empleadas para ello son muy diversas y dan el nombre a los distintos tipos de marcadores y pueden ser de carácter dominante o co-dominante. Algunos ejemplos de marcadores moleculares son: Polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP), Amplificación aleatoria del ADN polimórfico (RAPD), Polimorfismo en la longitud de los Fragmentos Amplificados (AFLP), Microsatélites o Secuencias simples repetidas (SSR).

Tabla 2. Características relevantes de los principales marcadores moleculares.

	Aloenzimas	RFLP	Mini - satélites	PCR	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 ADN	-	Alta	Alta	Baja	Baja	Baja	Media
Automatización	No	No	No	Si	Si	Si	Si

Fuente: Boletín técnico número 10 del Instituto Internacional de Recursos Genéticos Vegetales (IPGRI).

2.3.3 Marcadores microsatélites

Los microsatélites o SSRs son secuencias cortas de ADN (de 1 a 6 bases) repetidas en tándem. De acuerdo al número de bases repetidas pueden ser mononucleótidos (T)_n, dinucleótidos (AT)_n, tetranucleótidos (ATGG)_n, etc. Estos loci se encuentran en regiones codificantes y no codificantes del ADN y es probable que se formen por eventos de resbalamiento de la polimerasa que generan polimorfismos (Ferreira y Grattapaglia, 1998; Rentarúa, 2007).

El uso de los microsatélites como marcadores moleculares se inicia con el desarrollo y el uso masivo de la Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR) desarrollada por Mullis (1990). A pesar de que los microsatélites poseen altas tasas de mutación, las regiones flanqueantes son más conservadas y se emplean para hibridación de los iniciadores para la amplificación específica de los alelos de cada locus microsatélite (Khurana, 2003).

Los microsatélites han tomado ventaja sobre otros marcadores moleculares, como los AFLPs o RAPDs, por su alto polimorfismo, reproducibilidad y son de bajo costo una vez desarrollados (Ferreira y Grattapaglia, 1998; Khurana, 2003). Estos marcadores son ideales para desarrollar mapas genéticos (Jarne, 1996). De otro lado, cuando se analiza una combinación de loci la técnica se hace muy útil para experimentos de flujo génico, identificación de cultivares y análisis de paternidad, son marcadores de locus definido lo cual permite una mayor caracterización y seguimiento a través de especies, géneros y familias (Hokanson *et al.*, 1998).

Sin embargo, presenta desventajas cuando existe la necesidad de búsqueda de estos loci en el organismo a estudiar para el desarrollo de bibliotecas genómicas. Aun existiendo varias vías, éstas son complejas y costosas.

2.3.4 Marcadores microsatélites en el estudio de la papa

Los marcadores microsatélites fueron identificados y mapeados en *Solanum tuberosum* subsp. *tuberosum*, basándose en librerías genómicas y

búsquedas de base de datos de secuencias de genes. La homología de las secuencias microsatélites amplificadas se evaluaron en todas las especies de papas cultivadas, y se determinó que los marcadores moleculares desarrollados a partir de *S. tuberosum* subsp. *tuberosum* pueden ser utilizados en todas las especies de papa cultivada.

Así, los SSR se dieron a conocer con el trabajo de Provan *et al.*, (1996) donde utilizaron 22 pares de iniciadores microsatélites diseñados a partir de secuencias, no codificantes de genes de papa y 4 iniciadores de tomate; con los cuales diferenció 18 cultivares mejorados de papa tetraploide. Más tarde, Milbourne *et al.*, (1997) compararon de los sistemas de marcadores AFLP, RADP y SSR; que fueron los más empleados para diferenciar variedades de papas tetraploides europeas, llegando a la conclusión de que los SSR presentaban mayor polimorfismo y mayores ventajas en comparación a los otros marcadores.

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 estos, 65 microsatélites pudieron ser integrados a un mapa genético preexistente de papa en base a RFLPs.

Más adelante, Ashkenazi *et al.*, (2001) también utilizó estos recursos además de utilizar microsatélites de tomate previamente publicados. Confirmando una vez más el uso de SSR para identificar cultivares de papa. Feingold *et al.*, (2005) 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 Etiquetas secuencia expresada (ESTs). De estos, resultaron ser útiles un total de 61 SSR, que además fueron localizados en mapas genéticos ya existentes.

Ghislain *et al.*, (2004) desarrollaron en el CIP el set de SSR para la identificación genética de papa (PGI – kit con el fin de usarlo para caracterizar de manera rápida y eficiente diversas variedades de papa cultivadas y silvestres.

Reid *et al.*, (2009) obtuvieron resultados similares en la caracterización genética de varios cultivares de papa usando 9 marcadores microsatélites desarrollados en el departamento de agricultura de 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.

Los SSR se utilizaron en estudio de este cultivo; Raker y Spooner (2002) a través de estos marcadores pudieron separar ambas subespecies *andigena* y *tuberosum*. Del mismo modo fueron empleados en la selección de colecciones núcleo de *S. phureja*, *S. tuberosum* subsp. *andigena*, *S. tuberosum* subsp. *tuberosum*, *S. stenotomum* y *S. gonyocalix* (Ghislain *et al.*, 2004; 2009).

Estos microsatélites también han sido aplicados en la verificación de identidad de las accesiones del banco de germoplasma, mantenidas en campo, invernadero, *in vitro* y criopreservadas (Ames, 2003; Condori, 2003). Del mismo modo, los SSRs se aplicaron en la determinación de las relaciones taxonómicas entre especies cultivadas de papa (Zorrilla, 2006).

Ghislain *et al.*, (2009) desarrollaron el set de Identificación Genética de Papa (PGI), el cual consta de 24 marcadores microsatélites, con la finalidad de establecer una manera rápida y eficiente de caracterizar las variedades de papa cultivadas.

Este set de marcadores microsatélites es muy útil para la caracterización del germoplasma debido a su alto contenido de información polimórfica, amplia cobertura del genoma (dos SSRs por cromosoma) y de buena calidad de amplificación, tal como se determina por la claridad y la reproducibilidad del ensayo.

Así mismo, en Chile se caracterizó germoplasma de papas nativas chilenas con el uso de 6 SSR en 800 accesiones e identificaron 271 accesiones diferentes de papas nativas (Rodríguez *et al.*, 2012).

2.4 GENÉTICA DE POBLACIONES

La genética de poblaciones resulta del cumplimiento de tres condiciones siguientes: variación fenotípica entre los individuos de una población, supervivencia o reproducción diferencial asociada a la variación, y herencia de la variación.

Cruz (2003) señala que la genética de poblaciones es una rama de la genética donde se estudia la variabilidad de las poblaciones naturales, expresada en frecuencias genotípicas y alélicas, la relación entre ellas así como los mecanismos que la hacen variar en generaciones consecutivas. Los marcadores moleculares permiten identificar los genotipos y los alelos presentes en cada población de estudio.

2.4.1 Erosión genética

Se denomina erosión genética a la pérdida gradual de la diversidad genética. Generalmente es aceptado que una cantidad significativa de erosión genética ocurre y sigue ocurriendo con la destrucción de ecosistemas y hábitats por las actividades humanas, existe muy poca información sobre las cantidades precisas y extensión de la pérdida (Sevilla y Holle, 2004).

Ciertamente, debido a las preferencias alimenticias actuales ha habido un dramático incremento del uso de un pequeño número de cultivos uniformes altamente seleccionados. Esto ha sido asociado a la reducción del número de cultivares nativos (en especial en países en desarrollo) y a la reducción de áreas en donde cultivos tradicionales y nativos crecían.

La extensión de la pérdida de diversidad alélica de cultivos particulares no ha sido establecida. En el caso de la papa, se sabe que su biodiversidad corre peligro, ya algunas variedades antiguas cultivadas durante milenios se han perdido y las especies silvestres sufren alteraciones a causa del cambio climático (ONU 2008).

2.4.2 Variación genética

La variación genética está asociada al genotipo y puede detectarse mediante tecnologías moleculares que evidencian polimorfismos, los cuales resultan útiles como marcadores genéticos, la mayoría de los métodos se limitan a cierto número de genes o loci. La variación entre poblaciones de una especie, más la variación dentro de las poblaciones es la diversidad genética total (Sevilla y Holle, 2004).

Si no hay variación genética para una característica dentro de una población, el carácter no puede ser modificado por selección natural, por ello es que la variabilidad genética constituye la base del progreso genético (Rochambeau *et al.*, 2000). Y en el caso que este carácter sea afectado por un cambio en el ambiente o en las condiciones de vida se corre el riesgo que la población desaparezca.

Los individuos de una especie difieren entre sí en muchas características. Esas diferencias tienen causas genéticas y ambientales. Toda la variabilidad genética se origina por mutación. En su concepto más simple la mutación se produce por un cambio en un nucleótido en el sector de la cadena de ADN que codifica a un gen (Ritter *et al.*, 2010).

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 (Mendoza y Haynes, 1974; Estrada, 2000). Esta variabilidad tienen un alto valor para la mejora genética de la papa (Ritter *et al.*, 2010).

2.4.3 Polimorfismo genético

Es la coexistencia de dos o más fenotipos alternos en una misma población o entre poblaciones. Por lo general, los diversos fenotipos son originados por los alelos alternos de un gen, se refiere a la coexistencia de patrones alternos de bandas o variantes de ADN que se evidencian mediante métodos de detección (IPGRI y Cornell University 2004).

2.4.4 Distancia genética

Las distancias genéticas son estimadores del tiempo de separación entre poblaciones y se basan en ciertas diferencias genéticas existentes dentro y entre poblaciones.

Las distancias genéticas ayudan a entender las relaciones evolutivas entre poblaciones y nos permite obtener información para 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.

Los valores de distancia genética van de 0 al infinito, por ejemplo si dos poblaciones tienen similares frecuencias alélicas, la similitud genética podría ser 1 por lo tanto, la distancia genética sería 0 (Freeland, 2005).

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.

2.4.5 Análisis de varianza molecular (AMOVA)

El análisis de varianza molecular permite describir la variación genética dentro o entre grupos de poblaciones y determinar agrupamientos entre poblaciones. Inicialmente se usó en el estudio de poblaciones humanas analizando perfiles de RFLP de ADN mitocondrial (Excoffier, *et al.*, 1992). Más adelante AMOVA fue utilizado para el estudio de la ecología animal, vegetal y microbiana usando RAPS, microsatélites y secuencias de ADN (Huff *et al.*, 1993; Paffeti *et al.*, 1998; Mengoni *et al.*, 2000). Así mismo se

han realizado análisis AMOVA utilizando microsatélites en cultivos vegetales de importancia mundial. Es un método que sirve para estudiar la variación molecular dentro de una especie.

La variación genética de acuerdo con el AMOVA 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.

En estudio de papa de Haan *et al.*, (2010) utilizaron este análisis para comparar la estructura genética de subpoblaciones de papas nativas del departamento de Huancavelica.

2.5 ANTECEDENTES

Lamentablemente trabajos de investigación sobre papas “kurau” no han sido reportados. Sin embargo, existen evidencias que fueron colectadas en diferentes lugares de Huamalies, Huánuco, Pachitea, Ambo, Dos de Mayo provincias pertenecientes a la Región Huánuco y están inscritas en la base de datos de 1947 – 1997 en el libro “Las papas del Perú” (Ochoa, 1999; 2003).

En nuestro país es escasa la información sobre papas “kurau”. En el trabajo de Seminario (2004), realizado junto con la Universidad de Cajamarca, el Centro Internacional de la Papa y la Agencia Suiza para el Desarrollo y la Cooperación, se hace mención a la papa “kurau” como un ejemplo de cosecha sin plantación. Por otro lado, un estudio realizado en el Centro Internacional de la Papa (no publicado) determinó que las papas “araq” de diferentes lugares son tetraploides al ser analizadas por citometría de flujo.

Respecto a trabajos en Sistema de Información Geográfica se hicieron estudios tomando referencias de diferentes países del mundo lo que ha servido para determinar lugares de variación de la agricultura mundial (Hijmans, 2002).

2.6 VARIABLES E INDICADORES

Variables

1. Distribución espacial
2. Estructura genética

Indicadores

1. Puntos de Georeferenciación(SIG)
2. Frecuencias alélicas(SSRs)

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 LUGAR DE EJECUCIÓN

Fase campo:

El trabajo de investigación en la fase campo se realizó en 3 provincias de la Región Huánuco entre los meses de Enero y Junio del 2013. Las zonas de estudio se indican a continuación:

Tabla 3. Zonas con presencia de papas “kurau”.

PROVINCIA	ALTITUD Referencial (msnm*)	Zonas con SIG + SSRs	Zonas con SIG
Yarowilca	3290	Obas	Chupan
		Chacabamba	Cahuac
Huamalíes	3527	Singa	Chavín de Pariarca
		Llata	Puños
Ambo	3055	Huacar	San Rafael
		Tomayquichua	Colpas

*msnm: metros sobre el nivel del mar.

Fase laboratorio:

El trabajo molecular se llevó a cabo en los laboratorios de Biología molecular del CIP – Lima, entre los meses de Julio del 2013 hasta Agosto del 2014.

Fase gabinete:

Los trabajos de gabinete fueron realizados en las instalaciones (Oficina, biblioteca, centro de computadoras) del CIP-Lima, durante los meses de Julio del 2013 a Marzo 2015.

3.2 EQUIPOS, MATERIALES Y REACTIVOS

3.2.1 Equipos y Materiales de Campo

Equipos y materiales para la toma de punto de referencia geográfica

Equipos

- GPS Garmin Oregon
- Cámara fotográfica

Materiales

- Lápices
- Libreta de campo

- Laptop
- USB
- Programa de GPS
- Pilas Duracell AA

Materiales para la colecta de muestras de hojas

- Cajas de tecnopor
- Papel toalla
- Guantes
- Bisturíes
- Libreta de campo
- Bolsas de polipropileno
- Lápiz, tajador
- Tablero de apunte
- Cinta adhesiva
- Compresas de hielo
- Pizetas
- Alcohol de 96°
- Agua destilada

3.2.2 Equipos, Materiales y Reactivos de Laboratorio de biología molecular

Equipos:

- Microcentrifugas
- Balanza analítica de precisión
- Termocicladores
- Destructor de tejidos FAST-PREP
- Transiluminador
- Digitalizador de imágenes
- Baño María
- Micropipetas
- Analizador automático de ADN LI-COR
- Autoclave
- Campana de extracción

- Laptop
- Congeladora (-20°C)
- Refrigeradora (4°C)
- Cámara de electroforesis horizontal para geles de agarosa
- Espectrofotómetro Epoch BioTek

Materiales:

- Puntas para micropipetas
- Cajas para puntas
- Tubos de 1.5 mL
- Tubos de 2.0 mL
- Placas para PCR de 96 pozos
- Tapas para placas de PCR
- Cajas para tubos de 1.5 mL
- Gradillas para tubos de 1.5 mL
- Bolsas para autoclave
- Cajas para hielo
- Hielo
- Cinta de autoclave
- Plumones de tinta indeleble
- Papel aluminio
- Papel toalla
- Probetas
- Matraces Erlenmeyer
- Moldes y peines para geles de agarosa

Reactivos usados en laboratorio:

- Agarosa
- Cloroformo
- Alcohol Isoamílico
- Bromuro de cetil-trimetil amonio (CTAB).

- Tampón de carga SALB
- Mercaptoetanol
- Etanol al 70%
- Etanol al 90%
- Tampón Tris-EDTA (T₁₀E₁)
- Tampón Tris-Borato-EDTA (TBE)
- Isopropanol
- Colorante de ADN Gel-Red
- Agua destilada
- Tampón de carga Blue STOP Solution
- Ácido etilen-diamino-tetraacético (EDTA)
- Alcohol de 96°
- Alcohol de 70°
- Iniciadores de PCR
- Enzima *Taq* ADN polimerasa
- Tampón de PCR BOBs
- Iniciadores M13 marcados
- Desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTPs)
- Agua libre de nucleasas y Enzima ARNsa.

3.2.3 Material Biológico

Se colectó foliolos de plantas jóvenes de papas “kurau” (aproximadamente 220 mg) que se utilizó para los procesos de laboratorio y evaluación con los marcadores microsatélites.

3.2.3 Equipos, materiales de gabinete:

- Laptop
- Lápiz
- Papel bond
- Impresora
- Usb

3.2.4 Programas Informáticos

- **DARwin 6.0** (Perrier & Jacquemoud-Collet, 2010), paquete informático para el cálculo del índice de disimilitud, análisis de agrupamiento y elaboración de dendrogramas.
- **Arlequín 3.5** (Excoffier & Lischer, 2010), paquete informático para el análisis de datos de genética de poblaciones como el análisis de variancia molecular (AMOVA).
- **Structure 2.3** (Pritchard *et al.*, 2000), paquete informático para la inferencia de la estructura poblacional.
- **Saga Generation 2** (LI-COR Biosciences), paquete informático para automatizar las corridas electroforéticas, alineamiento de muestras, calibración de marcadores de referencia, calibración del tamaño de bandas y el registro de los alelos SSRs.
- **Gen5 Microplate** (BioTek Instruments), paquete informático para la cuantificación de la cantidad de ADN.
- **ArcGIS Desktop 10** (ESRI 2011), paquete informático para la gestión de puntos de referencia geográfica y elaboración de mapas.
- **MaxEnt 3.3** (Phillips *et al.*, 2006), paquete informático para elaborar mapas de predicción de distribución de especies.
- **Microsoft Office 2010** (Microsoft Corporation), programa para la gestión de textos, cuadros, tablas y figuras.

3.3 CONDUCCIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

La investigación se llevó a cabo en dos fases; la de campo y laboratorio y uno final de gabinete.

3.3.1 Fase de campo:

3.3.1.1 Selección de Zonas de Estudio

Para la selección de las provincias y zonas de estudio, se tomó en cuenta una investigación realizada por el CIP en las diferentes provincias de la Región Huánuco (datos no publicados), la cual reportó la presencia de papas “kurau” en

esta región. Así mismo, se hizo entrevistas a colegas estudiantes procedentes de distintas zonas de la Región Huánuco; que confirmaron la presencia de este tipo de papas. De esta manera, se seleccionaron 3 provincias: Yarowilca, Huamalíes y Ambo.

Para iniciar con las exploraciones de las zonas, se tomó en cuenta la etapa fenológica de las plantas de papas kurau, ya que era necesario encontrar plantas en sus primeras etapas para la colecta de los folíolos jóvenes por tanto; entonces se optaron por las provincias de Yarowilca, Huamalíes y Ambo en respectivo orden de visita.

Se visitaron campos de cultivos de los distritos donde se eligieron 12 zonas: Chupan, Obas, Chacabamba y Cahuac en la provincia de Yarowilca; en Huamalíes los distritos de Chavin de Pariarca, Singa, Llata y Puños. En Ambo se visitaron los distritos de San Rafael, Huacar, Colpas y Tomayquichua (Tabla 3).

3.3.1.2 Obtención de Puntos de Referencia Geográfica

Para el estudio de distribución espacial, se consideraron zonas distanciadas 20 Km aproximadamente (dentro de cada provincia). Dentro de cada zona, se trató de considerar 500 m de distancia entre parcelas.

Las zonas no muestreadas fueron Chupán, Choras y Chacabamba estos 2 últimos tomados como una misma zona de estudio. En Huamalíes, se tomó Chavín de Pariarca y Puños, San Rafael y Colpas en Ambo.

En cada zona, se registraron puntos de referencia geográfica en 10 parcelas. En cada parcela, los puntos se registraron de la siguiente manera: de los vértices de la parcela y de 2 plantas (las más distanciadas posibles); en una de éstas 10, en la que se halló el mayor número de plantas de papas “kurau”, se tomaron los puntos de todas las plantas existentes para poder determinar la distribución de la ocurrencia dentro de la parcela.

En aquellas zonas donde se colectaron foliolos, también se registraron los puntos de referencia geográfica de todas las plantas tomadas. Además, se hicieron gráficos de la forma de las parcelas donde se ubicaron los puntos de los vértices y de las plantas evaluadas que sirvieron de guía para graficarlos virtualmente con el programa ArcGIS. En total, se muestrearon puntos SIG en 120 parcelas de las 3 provincias de la Región Huánuco consideradas en este estudio.

3.3.1.3 Muestreo de foliolos de papas kurau

Se colectaron muestras de foliolos de papas “kurau” en 6 zonas: Obas, Cahuac (Yarowilca); Singa, Llata (Huamalíes) y Huacar, Tomayquichua (Ambo).

Se colectaron muestras de 12 plantas (las más distanciadas) en cada parcela y se consideraron 10 parcelas por cada zona. En total, se muestrearon foliolos de 720 plantas. Para ello, se colectaron los foliolos de hojas jóvenes (aproximadamente 220 mg) del ápice superior de la planta.

Éstos se colocaron en una hoja de papel toalla húmeda, luego se colocaron dentro de una bolsa de plástico y se rotuló la bolsa con el código correspondiente. El código incluyó el número de la provincia, el número de la zona, el número de la parcela y el número de la planta. Las bolsas fueron colocadas en una caja tecnopor que contenía compresas de hielo, para que mantuvieran las muestras en buen estado, seguidamente fueron enviadas al CIP, donde se prosiguió con los procesos en el laboratorio.

3.3.2 Fase de laboratorio:

3.3.2.1 Extracción de ADN

Las muestras se colocaron en tubos de 2 ml conteniendo tampón CTAB al 2% y una villa cerámica, y fueron almacenadas a -20°C hasta el día de extracción de ADN.

La extracción del ADN genómico se realizó con el método de pequeña escala siguiendo en protocolo establecido por el Laboratorio de Biotecnología Aplicada del CIP (2004). Terminado el proceso, el ADN fue secado a temperatura ambiente por 2 horas, y se re-suspendió en 150 µl de tampón T₁₀E₁ (anexos II).

3.3.2.2 Digestión con ARNasa

Una vez que el ADN estuvo completamente re-suspendido en T₁₀E₁, se agregó 3 µL de ARNasa a cada muestra y se incubó a 37° C durante 1 hora y media.

3.3.2.3 Calidad de las Muestras de ADN en geles de agarosa

Para determinar la calidad del ADN extraído, las muestras se cargaron en geles de agarosa al 1% y luego se realizó una electroforesis a 90 voltios por 1 hora. Los geles se prepararon con agarosa (al 1%, grado molecular) y tampón TBE 1x.

Se utilizaron moldes medianos con capacidad para 2 peines de 20 pozos. Previo a cargar las muestras en el gel, se mezcló 1.5 µL de ADN con 10 µL del tampón SALB 1X (el cual contiene Gel-Red 10X). Como controles, se utilizó ADN de *Solanum tuberosum* subsp. *tuberosum* en 3 concentraciones 100, 200 y 400 ng/µL.

La calidad del ADN se determinó por observación de las bandas, en las cuales se evaluaron la forma y el grosor de las mismas. La forma nos indicó cuán íntegro estaba el ADN; bandas difusas y/o presencia de un barrido indicaban que el ADN estaba degradado.

El grosor nos indicó cuánto de ADN (estimación relativa visual) se había extraído en comparación con los controles, bandas delgadas indican deficiente cantidad de ADN. Además, se evaluó la presencia de ARN. En aquellos casos donde se observó rastros difusos (smear) de ARN, las muestras se volvieron a digerir con ARNasa siguiendo el protocolo descrito anteriormente (anexos II, figura 21,22).

3.3.2.4 Cuantificación de las muestras de ADN

Las muestras de ADN se cuantificaron utilizando el espectrofotómetro Epoch y el programa Gen5. Se cargó 2 µL tanto de muestras negativas o blancos (tampón T₁₀E₁) así como de cada muestra en el espectrofotómetro. Para determinar la concentración de las muestras (en ng/µL), el espectrofotómetro obtuvo valores de absorbancia a 230, 260 y 280 nm.

La cuantificación se realizó por duplicado. El programa Gen5 se utilizó para hacer funcionar el equipo Epoch y gestionar la cuantificación de las muestras. Al final, el programa Gen5 resume los datos en cuantificación en un archivo Excel.

Una vez obtenido los resultados en Excel, se calculó el promedio de las lecturas de las 2 repeticiones y se dividió entre 3 (factor de corrección) para determinar la concentración de las muestras (anexos. figura 23).

3.3.2.5 Dilución de las muestras de ADN

Se prepararon diluciones de ADN a 5ng/µl (180 µL) en placas de 96 pocillos, para lo cual se aplicó la siguiente fórmula:

$$V_i = \frac{C_f \times V_d}{C_i - C_f} = \frac{5 \times 180}{C_i - 5}$$

Dónde:

C_i = Concentración inicial de ADN (calculado por Epoch)

C_f = Concentración final de ADN (5 ng/µL)

V_d = Volumen del diluyente (180 µL de Agua libre de nucleasas)

V_i = Volumen de ADN a agregar (en µL)

3.3.2.6 Amplificación de las regiones microsatélites

Se utilizó 23 de los 24 marcadores microsatélites que conforman el set de Identificación Genética de Papa (PGI) del CIP (Tabla 7). No se utilizó el marcador STM0019 debido a que, para su detección se utiliza la tinción con nitrato de plata y no el sistema LI-COR que fue el que se empleó para este trabajo.

Primero, se preparó la mezcla para la amplificación “Master Mix” siguiendo el protocolo para cada iniciador (Tabla 4, 5). Luego, se repartió 5 µl de “Master

Mix” en cada pocillo de una placa para PCR (para 96 muestras) con una pipeta repetidora. Finalmente, se adicionaron 5 μL de ADN a 5 $\text{ng}/\mu\text{L}$ con una pipeta multicanal. Los procesos se realizan sobre hielo para evitar degradación de ADN y reactivos sensibles al calor; trabajar en el menor tiempo posible con mucha cautela, siguiendo paso a paso el protocolo asignado.

Tabla 4. Protocolo I para la preparación de Master Mix.

Componente	Concentración	Volumen (μl)
		para 1 reacción
Agua libre de nucleasas		2.6
Tampón de PCR BOBs	10 X	1
dNTPs	5 mM	0.4
Iniciador Forward	1 μM	0.2
Iniciador Reverse	1 μM	0.3
Iniciador M13 marcado	1 μM	0.3
Taq ADN polimerasa	5 U/ μL	0.2
Sub-total		5
ADN	5 $\text{ng}/\mu\text{l}$	5
Total		10

Tabla 5. Protocolo II para la preparación de Master Mix.

Componente	Concentración	Volumen (μl)
		1 reacción
Agua libre de nucleasas		2.1
Tampón de PCR BOBs	10 X	1
dNTPs	5 mM	0.4
Iniciador Forward	1 μM	0.3
Iniciador Reverse	1 μM	0.45
Iniciador M13 marcado	1 μM	0.45
Taq ADN Polimerasa	5 U/ μL	0.3
Sub-total		5
ADN	5 $\text{ng}/\mu\text{l}$	5
Total		10

Una vez preparada la placa de PCR con Master Mix y ADN, la placa fue colocada en un termociclador para la amplificación de los marcadores microsatélite. Se siguió el protocolo de amplificación de cada marcador microsatélite propuestos por el CIP (Tabla 6).

Tabla 6. Protocolo de amplificación de PCR utilizado. T^oa: temperatura de hibridación específica para cada marcador microsatélite.

	Temperatura	Tiempo	Ciclos
	94°C	4 minutos	
Desnaturación	94°C	50 segundos	
Hibridación	T ^o a (cambia de acuerdo al usado)	50 segundos	(Según cada SSR)
Extensión	72°C	60 segundos	
	72°C	5 minutos	
Reposo	10°C	∞	

Tabla 7. Marcadores microsatélites utilizados del set de PGI.

Número	CIP 23-SSR	Código de Lab	Motivos repetidos	Cromosoma	PIC (Tbr)
1	STG0025	S203	(AAAC) _n	10	0.471
2	STM0031	S052	(AC) _n ...(AC) _n GCAC (AC) _n (GCAC) _n	7	0.756
3	STG0016	S194	(AGA) _n	1	0.757
4	STI0004	S211	(AAG) _n	6	0.746
5	STM5121	S121	(TGT) _n	12	0.595
6	STI0033	S226	(AGG) _n	7	0.774
7	STM5127	S127	(TCT) _n	1	0.811

8	STM1052	S084	(AT) _n GT(AT) _n (GT) _n	9	0.774
9	STM1106	S101	ATT) _n	10	0.820
10	STG0001	S179	(AAT) _n	11	0.757
11	STM1104	S081	(TCT) _n	8	0.826
12	STM1053	S036	(TA) _n (ATC) _n	3	0.618
13	STM0037	S042	TC) _n (AC) _n AA (AC) _n (AT) _n	11	0.843
14	STPoAc58	S029	(TA) _n	5	0.648
15	STI0003	S210	(ACC) _n	8	0.783
16	STM5114	S114	(ACC) _n	2	0.785
17	STI0012	S214	(ATT) _n	4	0.845
18	STI0014	S216	TGG) _n (AGG) _n	9	0.662
19	STI0032	S225	(GGA) _n	5	0.790
20	STI0001	S209	(AAT) _n	4	0.812
21	STG0010	S188	(TG) _n	3	0.798
22	STI0030	S224	(ATT) _n	12	0.846
23	STM1064	S027	(TA) _n (TG) _n GT(TG) _n	2	0.679

Terminada la amplificación, se agregó 5 µL del tampón de carga Blue Stop Solution a cada pocillo de la placa. La placa se cubrió con papel aluminio para evitar que la luz degrade los fluoróforos, los cuales marcaron a los fragmentos amplificados para su detección en el equipo LI-COR.

Las placas se entregaron al Servicio de Tipificación Genética del CIP, el cual es encargado de seguir con el proceso de detección de regiones SSRs de las muestras en el equipo LI-COR.

3.3.2.6.1 Detección de fragmentos amplificados

La detección (visualización) de los fragmentos amplificados se realizó a través del análisis de fragmentos del equipo LI-COR, el cual es automatizado y

utiliza geles de poliacrilamida al 6% (urea 8M). El equipo LI-COR 4300 es un sistema de análisis de fragmentos de ADN automático de alta resolución.

Este equipo permite secuenciar fragmentos de ADN, análisis de marcadores microsatélites, AFLP y detección rápida de polimorfismo de una solo nucleótido (SNP). El equipo trabaja junto al programa Saga GT, en el cual se define el orden de las muestras, los marcadores microsatélites a ser evaluados y el marcador de peso molecular (IRD 50-350).

El gel posee capacidad para 48 muestras en cada corrida, las muestras se cargan en grupos de 8 y el marcador de peso molecular es cargado al principio, al final y entre cada grupo de muestras. Como el equipo puede detectar 2 marcadores microsatélites a la vez, la amplificación de un marcador utiliza el iniciador M13 marcado con IRDye 700 y la amplificación del otro marcador utiliza el IRDye 800.

3.3.2.6.2 Identificación de Alelos Microsatélite

La identificación de los alelos microsatélite (fragmentos amplificados) en cada muestra se realizó a través del programa Saga GT. Este programa analiza las imágenes generadas por cada corrida en el equipo LI-COR, lo que permite identificar y alinear las muestras, calibrar el marcador de peso molecular y registrar (manualmente) los alelos.

Los alelos (bandas en la imagen obtenida) se definen por el tamaño, en pares de bases, determinado por el programa Saga GT. Las bandas que co-migran (presentan el mismo tamaño) fueron consideradas como el mismo alelo. Con este programa se registraron manualmente todos los alelos (bandas) encontrados en cada corrida (imagen) (anexos figura 24, 25).

Al final el programa reporta todos los tamaños de los alelos encontrados en cada muestra en un determinado marcador microsatélite. Este reporte se

transfirió a un archivo Excel para generar la matriz de 1s y 0s, donde 1 denota la presencia de un alelo (de un tamaño dado) y 0 denota la ausencia.

Se presentaron casos donde no se obtuvo amplificación en las muestras, la matriz de 1s y 0s se completó con 9s para esa muestra, lo que significa que presenta “datos perdidos”.

3.3.3 Fase de gabinete:

3.3.3.1 Análisis de datos SIG

Los datos que se tomaron con el equipo GPS fueron transformados y grabados en un archivo Excel. Una vez terminado el trabajo de campo, los datos fueron introducidos al programa ArcGIS para su procesamiento y análisis.

Con este programa, se diseñaron los mapas de distribución espacial de las parcelas por provincias, y en MaxEnt 3.3 se generaron las distribuciones de ocurrencia de las plantas totales de papas kurau en una parcela. Con este programa se analizaron las latitudes, longitudes y altitudes de los puntos tomados donde hubo presencia de papas “kurau”.

3.3.3.2 Análisis de mapas

Gracias al programa ArcGIS 10.2 se diseñaron 3 tipos de mapas a analizar: el primero donde se observan las 3 provincias y las zonas estudiadas en el mapa del departamento de Huánuco; segundo, se plasmaron 3 mapas una por provincia donde se aprecia la ubicación de las zonas geo referenciadas y el tercero indica las 12 parcelas con distribución y formas de ocurrencia de las plantas dentro de cada parcela.

3.3.3.3 Predicción de zonas de ocurrencia de papas kurau en Huánuco

Para determinar la predicción de zonas de ocurrencia de papas kurau se hizo uso del programa MaxEnt 3.3 (Phillips *et al.*, 2006), en el cual se utilizó parámetros de altitud, latitud, longitud, precipitación, humedad relativa, temperatura mínimas y máximas; para obtener un mapa del Perú con las posibles zonas de ocurrencia de papas kurau.

3.3.3.4 Análisis de datos moleculares

3.3.3.4.1 Determinación de heterocigosidad, riqueza alélica y haplotipos

- **Heterocigosidad esperada (He):** La heterocigosidad indica la proporción de individuos heterocigotos de una población. La heterocigosidad esperada (He) o diversidad génica (h) (Nei, 1973), es la probabilidad de que dos alelos escogidos al azar en una población sean diferentes (Weir, 1996).

La heterocigosidad fue calculada para cada una de las provincias y del mismo modo se prosiguió con los cálculos para las 6 zonas; el estimador se obtuvo aplicando la siguiente fórmula: $He = n/n-1 * (1 - \sum_{i=1}^n p^2)$

Donde:

He = heterocigosidad

n = muestra/población; **n/n-1** =factor de corrección; p es la frecuencia del alelo l.

- **Riqueza alélica:** para determinar el número de alelos, los genotipos estudiados fueron agrupados por provincias y zonas; seguido se definieron el total de alelos encontrados.

Las frecuencias relativas se obtuvieron sumando las presencias de cada uno de los alelos y dividiéndolos entre la sumatoria de alelos totales en el programa excel, también se calcularon los rangos, los promedios para cada provincia y zona, y se identificaron los alelos únicos a partir de una matriz de datos.

- **Presencia de haplotipos:** para determinar el número de haplotipos que nos dará una noción sobre la variabilidad entre las poblaciones de papas kurau; se contabilizaron los haplotipos totales y compartidos entre las provincias y zonas de estudio.

Se realizó haciendo uso de la matriz de datos procesados en el programa Arlequín, que posteriormente se transformó a panel de notas y finalmente fue transferido al programa Excel; donde se hicieron los conteos.

3.3.3.4.2 Análisis de agrupamiento

El análisis de agrupamiento se llevó a cabo utilizando el programa DARwin 6.0 (Perrier & Jacquemoud-Collet, 2006) con el que se generó un dendrograma que representan la relaciones genéticas y estructura de las poblaciones.

A base de la matriz de datos de 0s y 1s en Excel; se construyeron matrices de disimilitud aplicando el coeficiente de disimilitud (índice de Jaccar); el índice varía de 0 a 1, el primero cuando son muestras idénticas, en el segundo cuando se trata de muestras completamente diferentes y calcula la disimilitud entre cada para de muestras tomando en cuenta si comparten o no alelos entre ambos.

La fórmula para el cálculo de disimilitud es la siguiente:

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

Donde:

d_{ij} : disimilitud entre las muestras i y j

a : número de variables donde $x_i =$ presencia y $x_j =$ presencia

b : número de variables donde $x_i =$ presencia y $x_j =$ ausencia

c : número de variables donde $x_i =$ ausencia y $x_j =$ presencia

	j			
i	$\sum 1,1$	(a)	$\sum 1,0$	(b)
	$\sum 0,1$	(c)	$\sum 0,0$	(d)

El número de variables (d) ya no se emplea en la fórmula, por tratarse de valores de ausencias que dan como resultado muestras idénticas que podrían ser inapropiadas para el cálculo de disimilitud, ya que las ausencias alélicas podrían haberse dado diferentes mutaciones.

Después de calcular el índice de disimilitud entre muestras fue posible hacer uso del método de agrupamiento de Nieghborn Joining (vecinos más cercanos) para estimar los árboles filogenéticos (Saitou y Nei, 1987).

Se hicieron remuestreos computacionales (bootstrap) para repetir 20 000 veces el agrupamiento, eliminando aleatoriamente una muestra por cada repetición; así se determinó el porcentaje probabilístico que tiene de aparecer cada rama (cluster) si se generan determinado número de dendrogramas eliminando un dato a la vez.

Los dendrogramas fueron diferenciados por colores de acuerdo al grupo de muestras y procedencia.

3.3.3.2.3 Análisis de coordenadas principales (PCoA)

Para el análisis de coordenadas principales (PCoA), se utilizó el mismo programa DarWin 6.0. El PCoA es un análisis factorial que trabaja con matrices de distanciamiento en coordenadas bidimensionales que proyecta la estructura de los datos.

El análisis factorial y el método de agrupamiento constituyen dos diferentes enfoques para la representación de la estructura de la diversidad.

El PCoA muestra principalmente la representación de la diversidad total y no toma en cuenta los efectos individuales. Por otro lado, el método de agrupamiento representa las relaciones individuales y puede ser más exacto para toda la estructura. Estos dos métodos son complementarios (Perrier & Jacquemoud - Collet, 2006).

3.3.3.4.3 Análisis de Variancia Molecular (AMOVA)

La estructura genética se presenta cuando existen diferencias de las frecuencias alélicas, para dicho estudio se tiene que determinar si existen diferencias entre las provincias dentro de una región, o entre zonas de diferentes provincias; entonces el análisis es el indicado para este tipo de estudio (Excoffier, *et al.* 1992).

Para realizar el análisis molecular de varianza (AMOVA) se utilizó el programa Arlequin 3.5 (Excoffier & Lischer, 2010), con el cual se estimó el

porcentaje (%) de variación por cada nivel poblacional y índices de fijación (Weir 1996).

En AMOVA se divide la varianza total en términos de covarianza (Excoffier *et al.*, 1992): se obtuvo dividiendo la variabilidad entre los grupos ($\sigma^2 a$), entre poblaciones dentro de grupos ($\sigma^2 b$) y dentro de las poblaciones ($\sigma^2 c$).

Entonces, la variabilidad total ($\sigma^2 T$) queda de la siguiente forma (Tabla 8):

$$\sigma^2 T = \sigma^2 a + \sigma^2 b + \sigma^2 c$$

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 kurau: por provincias (Yarowilca, Huamalíes y ambo) y zonas (Obas, Cahuac, Singa, Llata, Huacar y tomayquichua).

Los componentes de la covarianza de AMOVA pueden ser usados para calcular el índice de fijación (F_{ST}) en términos de coeficiente de endogamia. En la definición más común el F_{ST} se basa en la varianza de las frecuencias alélicas entre las poblaciones (Holsinger & Bruce 2009).

$$F_{ST} = \frac{\sigma_S^2}{\sigma_T^2}$$

Donde:

$\sigma^2 S$: es la varianza en las frecuencias de los alelos en diferentes subpoblaciones.

$\sigma^2 T$: es la varianza en las frecuencias de los alelos en la población total.

Por ello, el F_{ST} representa el porcentaje de la variación genética que es atribuible a las diferencias entre poblaciones y grupos de poblaciones; el cual varía entre 0 (cuando no existe diferenciación) a 1 (cuando la diferenciación es completa, es decir, subpoblaciones fijadas para distintos alelos). Wright (1978) sugirió unas pautas generales para la interpretación de los valores de F_{ST} :

$0 \leq FST < 0.05$, indicaría poca diferenciación genética.

$0.05 \leq FST < 0.15$, indicaría una diferenciación moderada.

$0.15 \leq FST < 0.25$, indicaría alta diferenciación.

$0.25 \leq FST$, indicaría una diferenciación muy grande.

El AMOVA realizado se hizo comparando muestras de papas kurau por provincias y zonas.

Tabla 8. 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)	$\sigma^2_a + \sigma^2_b + \sigma^2_c$
Entre Poblaciones (P) dentro de los Grupos	P - G	SC (Entre Poblaciones/ dentro de los Grupos)	$\sigma^2_b + \sigma^2_c$
Entre Individuos (N) dentro de las Poblaciones	N - P	SC (Entre Individuos/ dentro de los Poblaciones)	σ^2_c
Total	N - 1	SC (Total)	σ^2_t

3.3.3.4.4 Análisis de estructura genética

Para tal propósito se empleó el programa Structure 2.3 (Pritchard *et al.*, 2000), el cual emplea un modelo basado en método de agrupamiento para inferir la estructura de poblaciones usando datos genotípicos de marcadores no ligados.

El programa asume un modelo en el cual existen k poblaciones (donde a “k” se le dio valores de 3 a 6) cada una de las cuales es caracterizada por un grupo de frecuencias alélicas en cada locus. Los Individuos son asignados (probabilísticamente) a poblaciones, o asignados a dos o más poblaciones si sus genotipos indican que hay mezcla.

IV. RESULTADOS

Los resultados obtenidos se detallan de la siguiente manera:

4.1 DISTRIBUCIÓN ESPACIAL (SIG)

4.1.1 Zonas de estudio

Se determinó 12 lugares en tres provincias de la Región Huánuco, se describen los lugares en cada provincia:

4.1.1.1 Provincia de Yarowilca

Esta provincia se encuentra a una altitud promedio de 3290 msnm, se caracteriza por tener zonas altas e intermedias para siembra de papas (nativas y comerciales), las zonas bajas o quebradas son destinadas al cultivo de maíz. Los cultivos son de secano. Su relieve es regularmente accidentado con presencia de valles, separada por el río Marañón. Su población habla español y quechua (en su mayoría agricultores de avanzada edad).

De los 8 distritos con que cuenta la provincia de Yarowilca se seleccionaron 4 zonas que fueron: Chupán, Obas, Chacabamba y Cahuac; por las siguientes razones: la presencia de poblaciones de papas kurau y el distanciamiento entre las zonas. Sin embargo, en todas las zonas se observó al ecotipo Shawinto de papa kurau que predominó en las diferentes parcelas de los centros poblados visitados y en todos ellos estuvo asociado al cultivo de maíz; como se muestra en la tabla 9.

Tabla 9. Ecotipos predominantes de papa kurau y cultivo asociado en la provincia de Yarowilca.

PROVINCIA	DISTRITO	CPM	ECOTIPO	CULTIVO ASOCIADO
Yarowilca	Chupán	Chupán	Puca	Maíz
	Obas	Shunkipampa	Shawinto o juito	Maíz
	Chacabamba	Chacabamba	Shawinto	Maíz
	Cahuac	Santa Rosa de cahuac	Shawinto y coleteo	Maíz

4.1.1.2 Provincia de Huamalíes

Esta provincia se encuentra a una altitud promedio de 3527 msnm. De relieve accidentado, esperan las lluvias a partir de finales de setiembre para realizar siembras de cultivos. El río Marañón se encuentra afluyendo por esta provincia, formando límites entre sus distritos.

Los principales cultivos predominantes son los cereales (Trigo, maíz, habas), pero también se siembra papas nativas en las zonas más altas. La mayoría de la población habla español y quechua.

Los agricultores denominan a este tipo de papa “kurau” en quechua y “tasca” en español. Los ecotipos existentes según los agricultores son: puca o kurau rojo, yana o kurau negro, yurac kurau blanco, punchauyina, rachachá, manzana kurau, chojti, ambarina, habas kurau, cuchpas (anexos II. figura 29), oque o martin kurau, pinto, pecto, azul kurau. No obstante, de los muestreados, los que predominan y se encuentran mayormente distribuidas son las que se presentan en la tabla 10. Además, no sólo se encuentra asociado al cultivo de maíz, sino también al de habas y otros.

Tabla 10. Ecotipos predominantes de papa kurau y cultivo asociado en la provincia de Huamalíes.

PROVINCIA	DISTRITO	CPM	ECOTIPO	CULTIVO ASOCIADO
Huamalíes	Chavín	Chavin de Pariarca	Puca, yana y yurac	Maíz y otros
	Singa	San Pedro del Marañón	Martín kurau u oque kurau	Maíz y habas
	Llata	San José de Libertad	Puca y yurac	Habas
	Puños	Santa Rosa	Puca	Otros

4.1.1.3 Provincia de Ambo

Ambo se encuentran a un promedio de 3055 msnm de altitud, es una provincia que consta de 8 distritos cuyo cultivo principal son los cereales (maíz,

trigo) y las papas nativas y comerciales. Tiene relieve accidentado como también valles y quebradas para los cultivos de maíz. Su población rural habla español y quechua (sobre todo los adultos mayores). Sus cultivos son de secano, pues esperan las lluvias para sembrar.

Los ecotipos que existen por esta provincia son: rauya, michcapapa, culeto o urampaseccpana, tantapapa, cusapapa, shawshiray, puca kurau, kurao guinda, yana senqa, yana kurau, yurac kurau, azul kurau, rosado kurau, puitish, sogochacuan, shawinto, chunokurau, cabrapashicran (testículos de cabra), habas kurau, yanagara, maucalucso (kurau morado) y Simona (blanco). Los ecotipos con mayor distribución y predominio se presentan en la tabla 11. En su totalidad se encontraron asociados al cultivo de maíz en todos los centros poblados visitados.

Tabla 11. Ecotipos predominantes de papa kurau y cultivo asociado en la provincia de Ambo.

PROVINCIA	DISTRITO	CPM	ECOTIPO	CULTIVO ASOCIADO
Ambo	San Rafael	Matihuaca	Culeto o Urampaseccpana	Maíz
	Huacar	Rauquín	Puca	Maíz
	Colpas	Yapag	Sogochacuan	Maíz
	Tomayquichua	Lucmas	Puca y yana	Maíz

4.1.2 Mapas de distribución espacial de papas kurau

Se generaron 8 mapas con el programa ArcGis 10.2. Mapas de ubicación geo referenciada de los materiales de estudio, mapas de ubicación de las zonas de estudio, mapas de distribución espacial de papas kurau dentro de las parcelas y mapa de predicción de ocurrencia de papas kurau.

4.1.2.1 Mapa de ubicación geo referenciada de la región Huánuco

Se obtuvo un mapa de la ubicación de las 3 provincias que se eligieron como motivo de estudio (figura 2). Dentro de las cuales se pueden apreciar las zonas donde se colectaron el material vegetal y se tomaron los puntos de referencia. Los de color rojo son las zonas donde se colectaron muestras y se geo referenció, mientras que en las zonas verdes solo se tomaron puntos SIG.

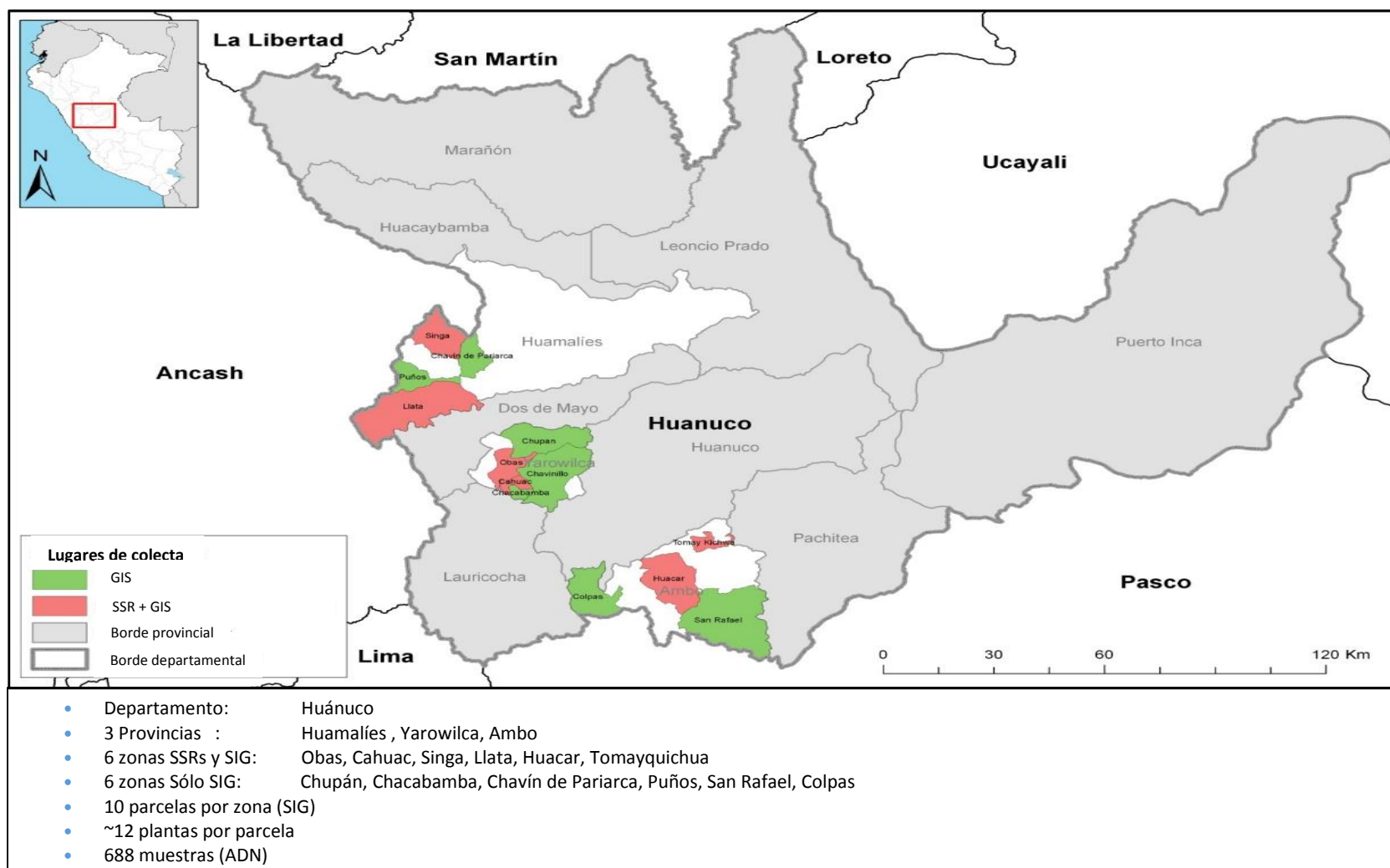


Figura 2. Mapa de georeferencia de las zonas de estudio en la Región Huánuco.

4.1.2.2 Mapa de ubicación geo referenciada de cada una de las zonas dentro de las provincias

- **YAROWILCA:** en esta provincia se eligió 4 distritos para 4 zonas, de las cuales en Chupán (3268 msnm) y Chacabamba (3272 msnm) solo se tomaron puntos SIG de 19 parcelas (9 Chupán, 10 Chacabamba), en Obas (3278 msnm) y Cahuac (3338) a parte del trabajo anterior, se colectó muestras para análisis molecular (figura 3).

- **HUAMALÍES:** Fue la segunda provincia de estudio; en las zonas elegidas se cumplieron las distancias propuestas ya que se tomaron muestras de zonas más lejanas una de la otra (figura 4). Las zonas seleccionadas fueron Chavín a 3269 msnm, Singa a 3470 msnm, Llata a 3590 msnm y Puños a 3781 msnm.

- **AMBO:** Fue la última provincia elegida para la investigación, no se cumplió con el distanciamiento propuesto, puesto que las plantas estaban senescentes (figura 5).

Se seleccionó a Huacar (2949 msnm) como primera zona de colecta, así mismo se encontró muestras para colectar en las zonas del distrito de Tomayquichua (2889 msnm), donde se encontraron plantas jóvenes de papa kurau.

4.1.2.3 Rangos de la geo referencia de las zonas de estudio y las provincias

Los rangos de altitud, latitud y longitud resultaron como se muestra en el Tabla 12 y anexo Tabla 21; y gráficamente se observan los mínimos y máximos en el gráfico de líneas (figura 6) donde se encuentra que las papas kurau están distribuidas desde los 2 500 hasta los 3800 msnm aproximadamente.

En latitud desde los 9° 23' 41.63" hasta los 10° 22' 30.71" y en longitud desde 76° 53' 41.28" hasta 76° 9' 31.31" (Tabla 12). A partir de las geo referencias se obtuvo el mapa de predicción de ocurrencias de papas kurau en la región Huánuco.

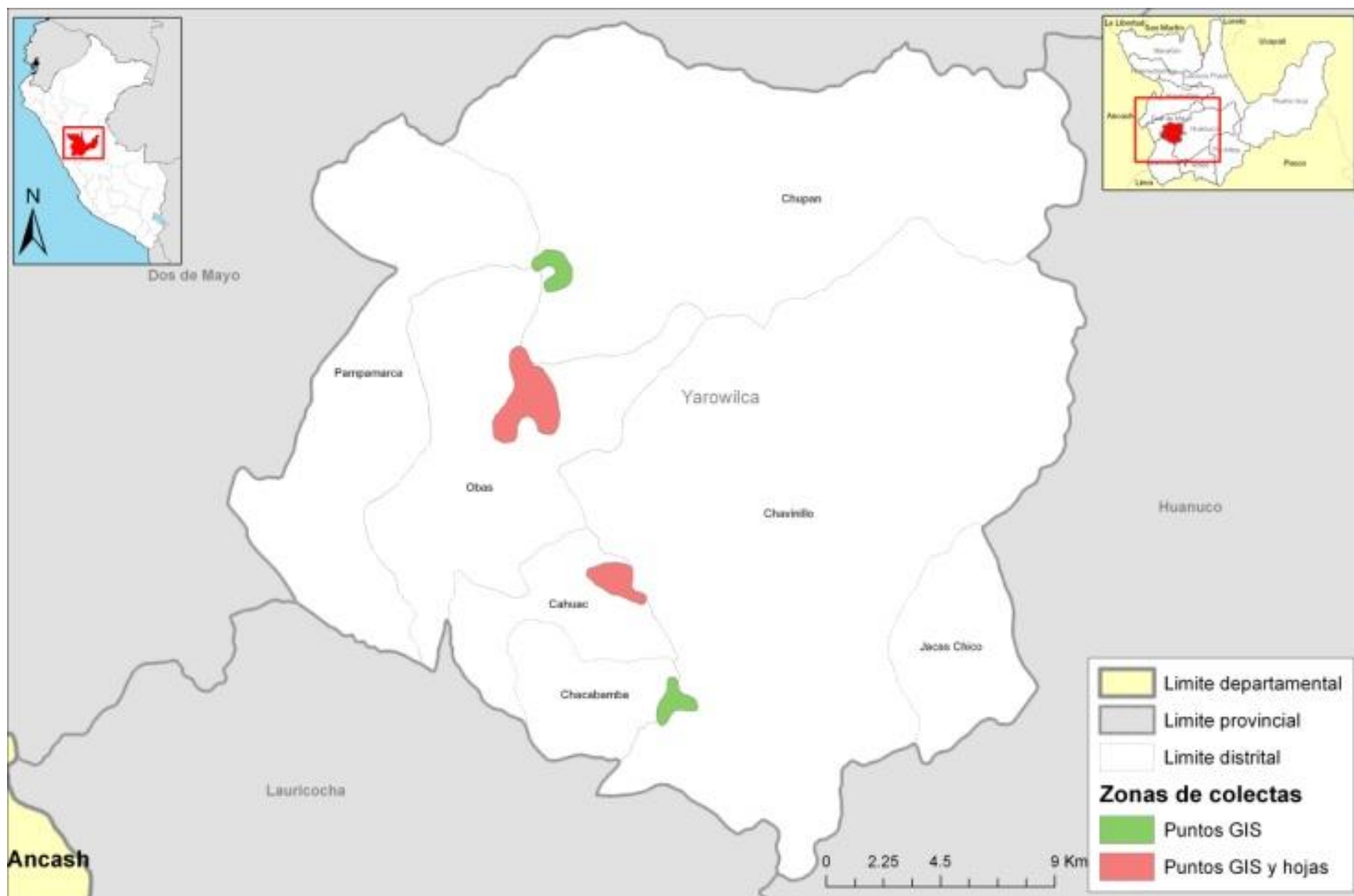


Figura 3. Ubicación geo referenciada de las provincia de Yarowilca y las zonas de estudio.

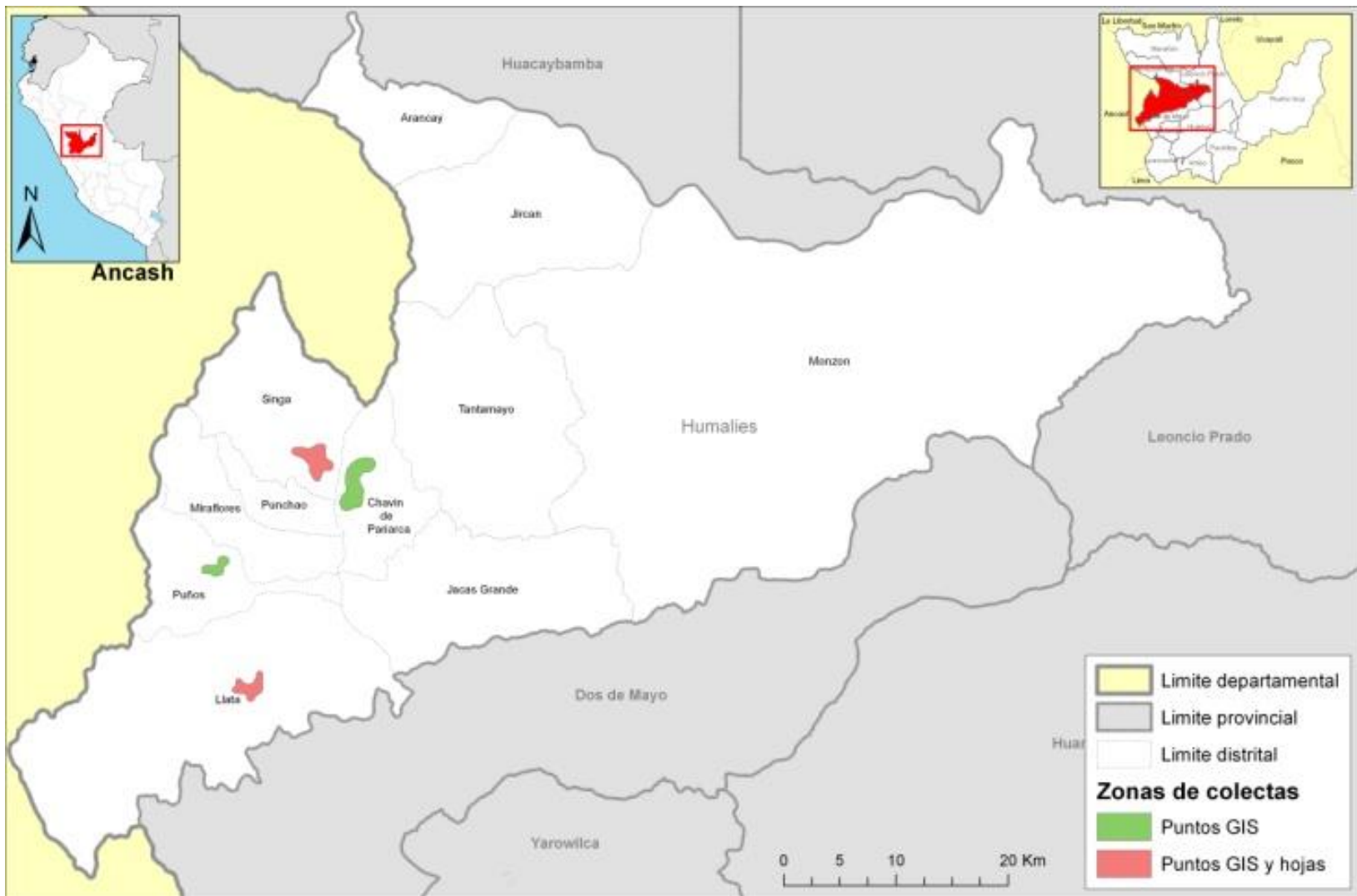


Figura 4. Ubicación geo referenciada de las provincia de Huamalés y las zonas de estudio.

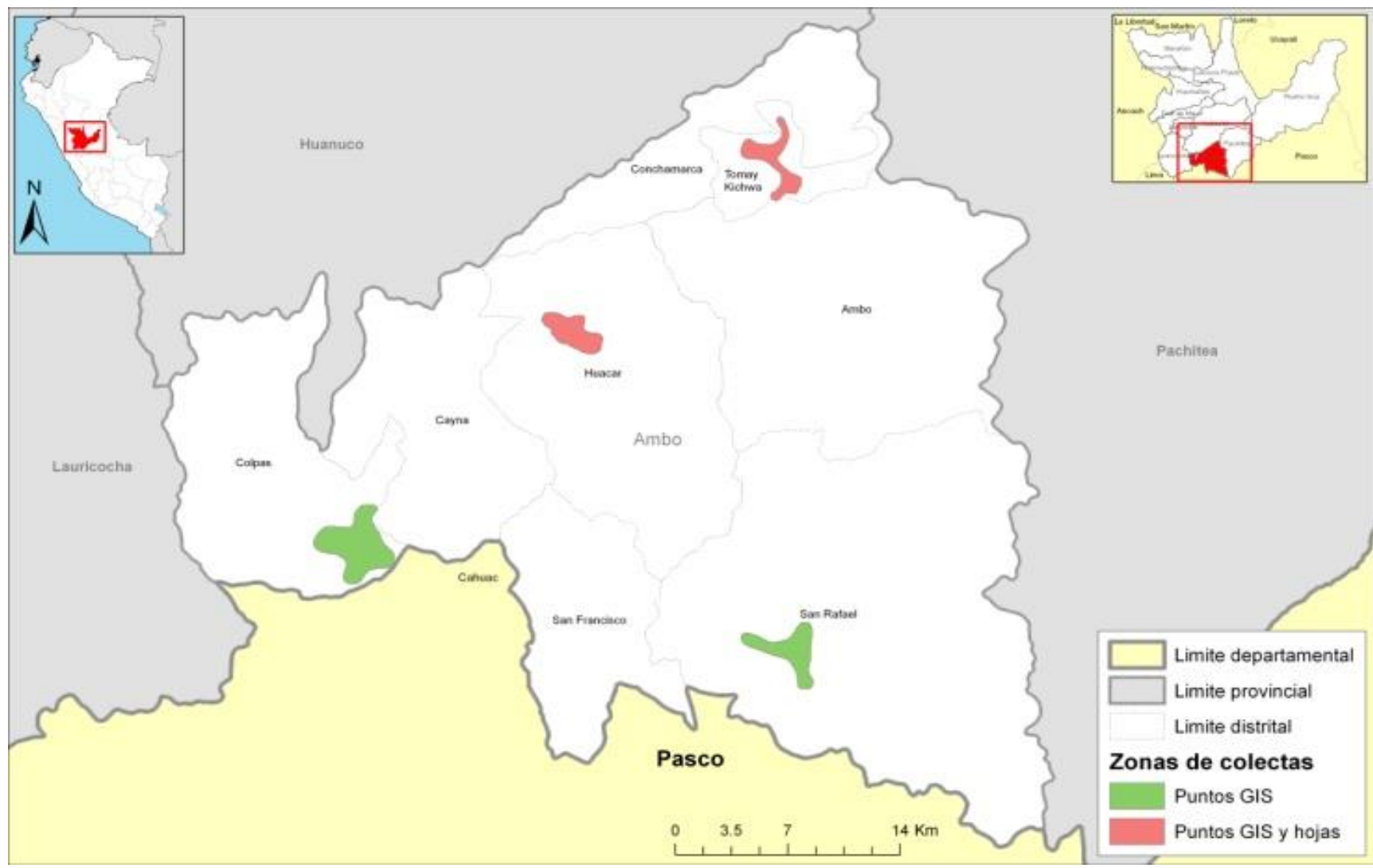


Figura 5. Ubicación geo referenciada de las provincia de Ambo y las zonas de colecta.

Tabla 12. Rango de Latitud y Longitud de ocurrencia de papas kurau por provincia

	Desde	Hasta	
Humalies	9° 23' 41.63"	9° 36' 21.95"	Latitud
	76° 53' 41.28"	76° 45' 17.64"	Longitud
Yarowilca	9° 44' 9.6"	9° 54' 32.03"	Latitud
	76° 40' 28.19"	76° 35' 52.43"	Longitud
Ambo	10° 1' 48.35"	10° 22' 30.71"	Latitud
	76° 26' 28.67"	76° 9' 31.31"	Longitud

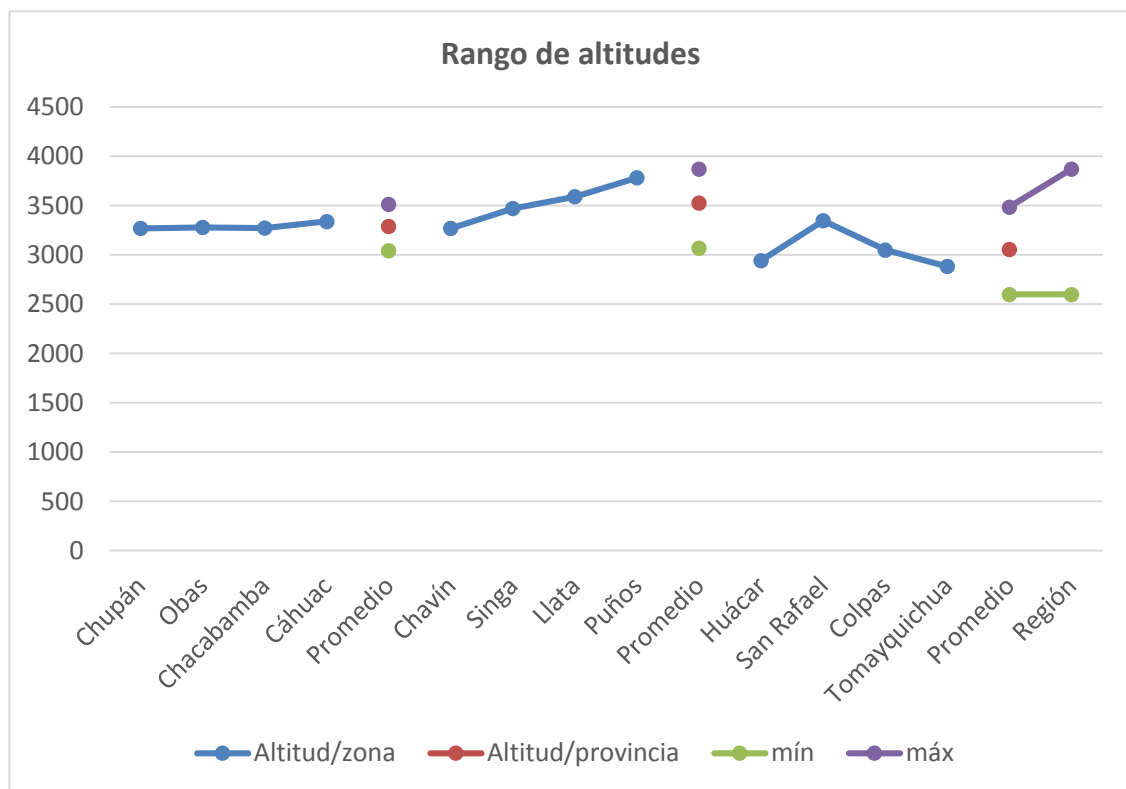


Figura 6. Resumen de altitudes de las zonas en estudio.

4.1.2.4 Mapas de distribución espacial de papas kurau dentro de las parcelas

Las plantas se encuentran distribuidas ampliamente por toda la parcela, no tienen tendencia agruparse aisladamente (figura 7).

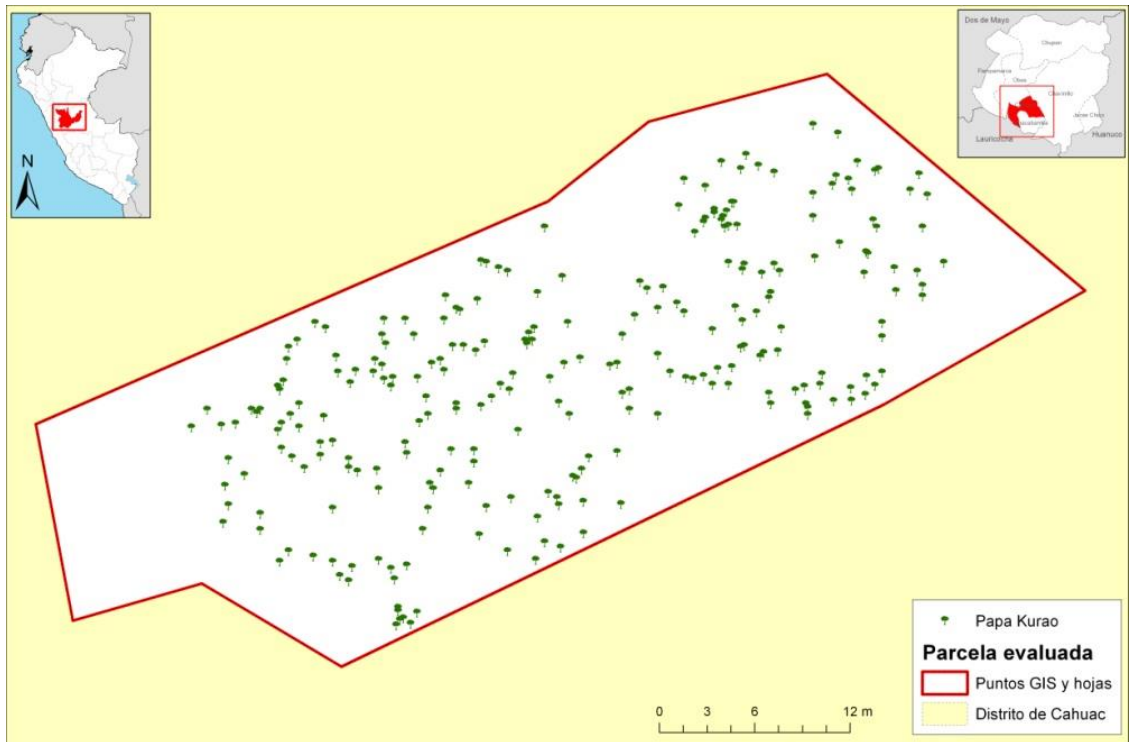


Figura 7. Mapa de distribución espacial total de papas kurau dentro de una parcela en Yarowilca.

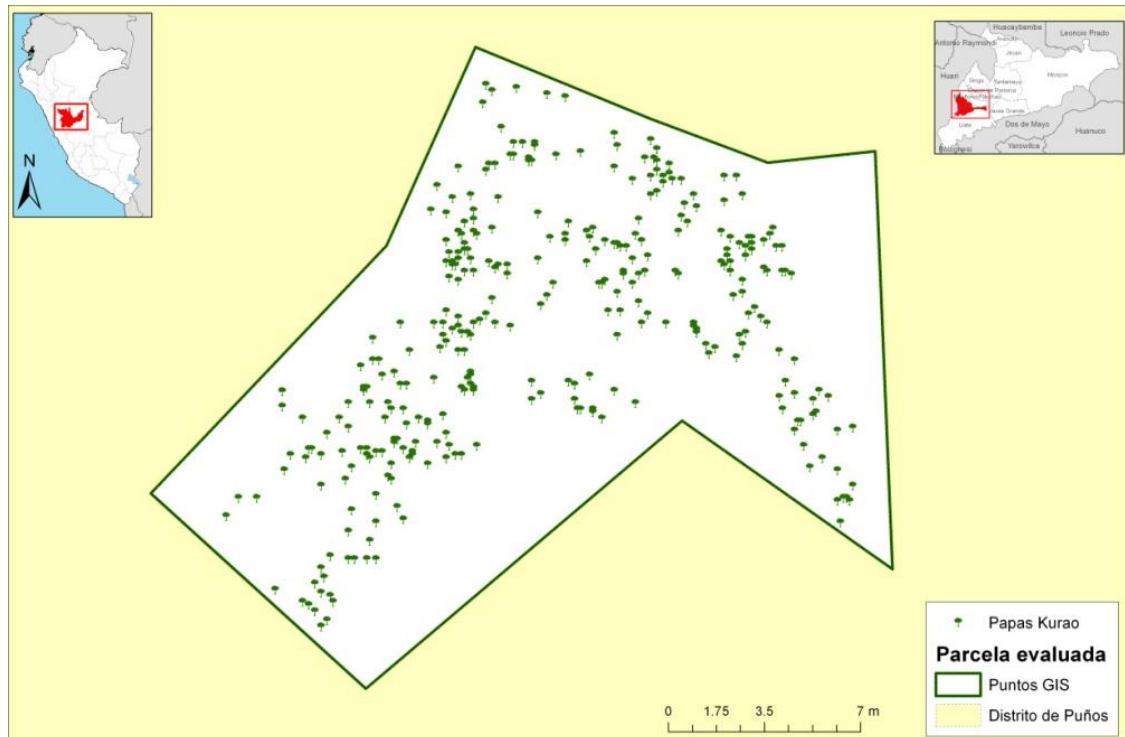


Figura 8. Mapa de distribución espacial total de papas kurau dentro de una parcela en Huamalés.

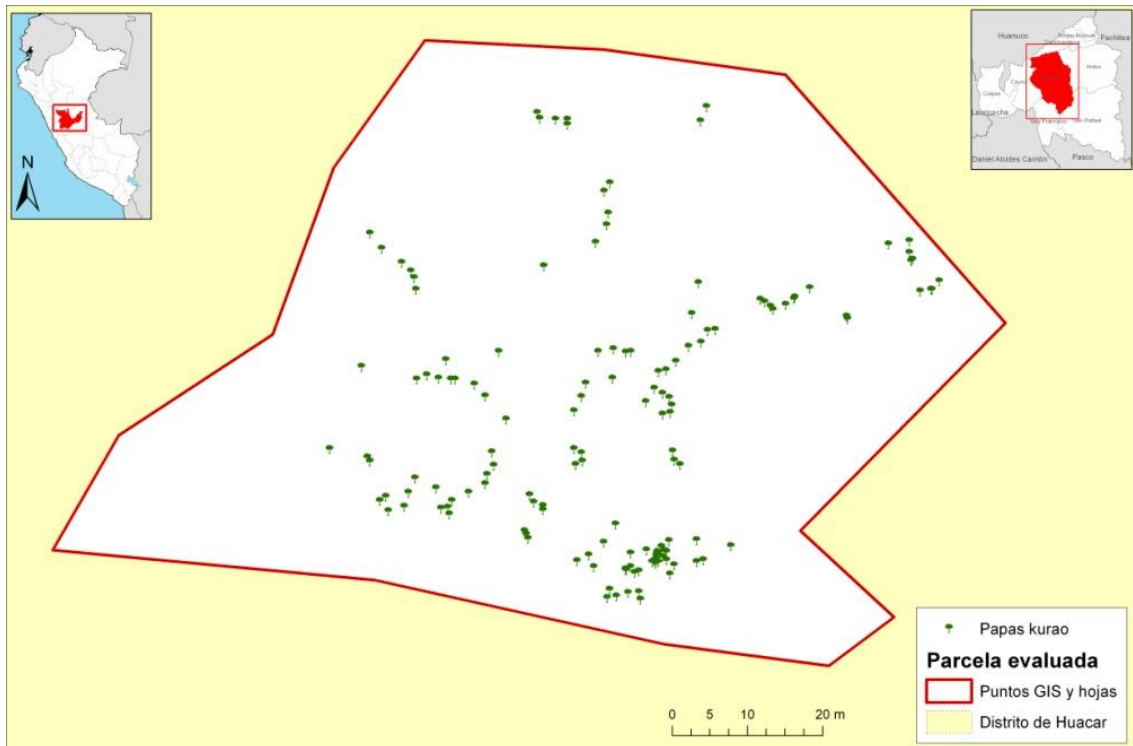


Figura 9. Mapa de distribución espacial total de papas kurau dentro de una parcela en Ambo.

En la provincia de Huamalíes también la distribución de las plantas no forma agrupaciones y se encuentra distribuida por toda la parcela. En cambio en Ambo se presenta una distribución más escasa en toda la parcela (figura 8).

4.1.2.5 Mapa de Predicción de ocurrencia de papas kurau en la Región Huánuco

Este mapa (figura 10) muestra que, de un 50 a 74% de probabilidad pueden ocurrir papas kurau o kurao en las siguientes 8 provincias Huánuco, Pachitea, Ambo (abundante), escasamente en Lauricocha, Yarowilca (confirmado por resultados del estudio), Dos de Mayo, Huamalíes y muy escaso en Huacaybamba.

Prediciendo con 30 – 50% de probabilidad, las papas kurau ocurrirían en las 8 provincias anteriormente mencionadas, con mayor probabilidad en las zonas de Huamalíes y Huacaybamba y se suman la posible ocurrencia en Marañón, quedando fuera de rango las provincias de selva Leoncio Prado y Puerto Inca.

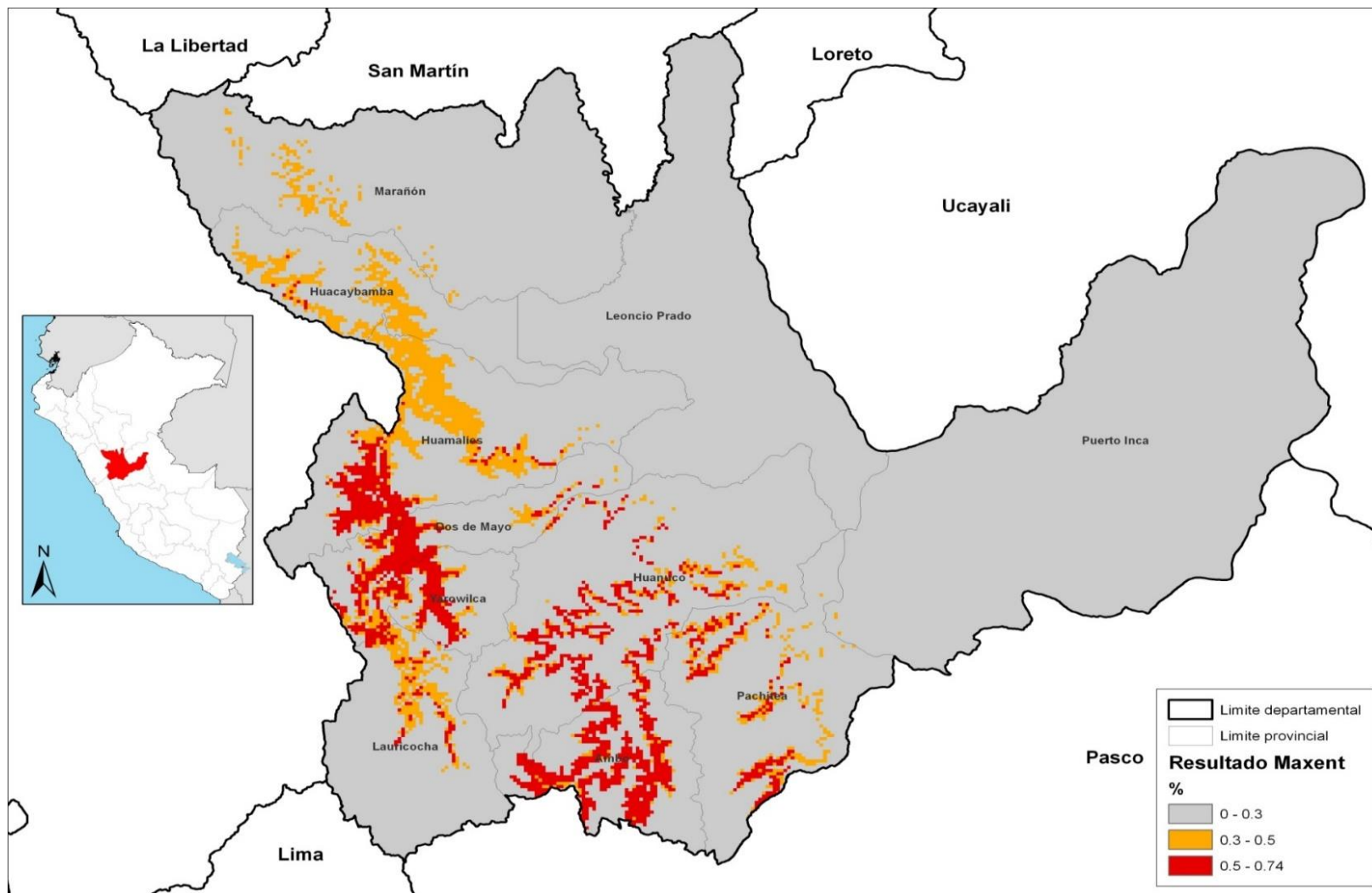


Figura 10. Mapa de predicción de provincias de ocurrencia de papas kurau en la Región Huánuco.

4.2 ESTRUCTURA GENÉTICA DE POBLACIONES

4.2.1 Caracterización mediante marcadores microsatélites

Del análisis previo para la determinación de estructura genética se determinaron los siguientes parámetros:

4.2.1.1 Registro de número de alelos por marcador

De las 720 muestras, 688 amplificaron en un solo locus para los 23 iniciadores microsatélites, mientras la diferencia (32 muestras) no amplificó. La amplificación de los 23 microsatélites resultó ser muy buena (figura 11, 12, 13).

El rango de los alelos encontrados va desde 4 hasta 13 con el marcador STM0037 (Tabla 13) teniendo como promedio 8.2 alelos por locus (Tabla 14).

Los marcadores microsatélites STG0106, STI0012, STG0016, STI0030, STI0003, STM5127 y STM0037 resultaron ser más polimórficos encontrándose desde 10 alelos hasta 13 en orden respectivo. Los menos polimórficos fueron STM5121 y STG0025 con cuatro alelos encontrados en el análisis de las 688 muestras.

Los SSR con alelos más frecuentes son STM1104, STI0030, STPoAc58, STG0016, STM5127 los cuatro primeros con 6 alelos frecuentes y el último con 7 alelos frecuentes. En los marcadores menos polimórficos los alelos presentes fueron todos frecuentes para STM5121, y para STG0025 se encontró tres alelos frecuentes y uno raro.

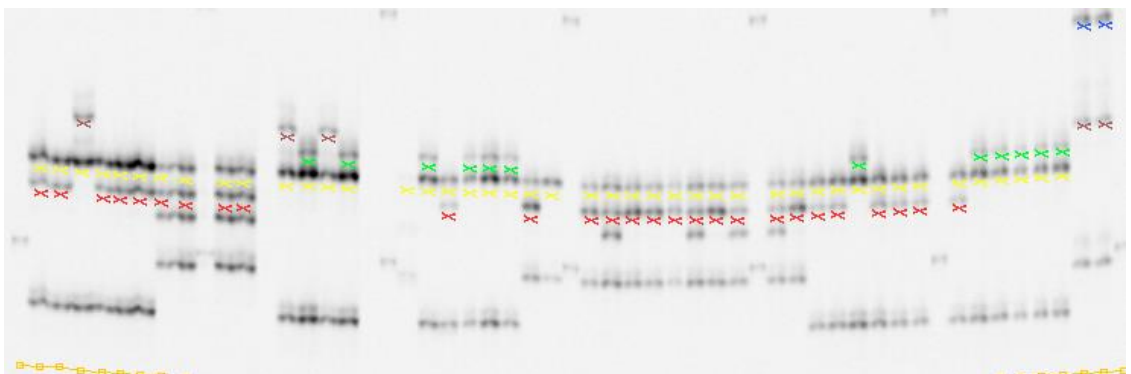


Figura 11. Patrón del marcador microsatélite STG0016 amplificado en Licor con IRD 700, las aspas señalan tamaño de alelo.

Tabla 13. Número y tamaño de los alelos amplificados por microsatélite.

SSR_CIP	Total/SSR	Total de alelos encontrados en las en tres provincias												
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
STM0037	13	89	91	93	95	97	99	101	103	105	106	107	109	113
STM1104	7	184	187	188	190	191	194	196						
STM1052	6	226	227	235	237	243	244							
STM1106	10	145	154	166	169	172	175	178	181	190	211			
STM5114	8	299	302	305	308	311	314	317	320					
STM5127	12	254	255	257	258	259	260	263	266	269	276	285	288	
STG0010	8	175	176	177	180	181	182	184	186					
STI0004	7	95	98	101	107	113	119	122						
STI0012	10	183	184	186	189	191	201	204	207	209	211			
STI0030	11	106	108	109	110	111	114	117	118	120	123	127		
STI0032	8	127	130	133	136	139	142	145	148					
STI0033	7	131	137	140	143	149	152	155						
STM1064	7	187	206	207	208	209	211	213						
STPoAc58	9	245	247	248	249	251	255	257	261	263				
STM1053	6	170	183	186	189	190	192							
STM0031	9	186	195	197	198	202	204	206	207	212				
STM5121	4	300	303	306	307									
STG0001	9	142	144	146	148	149	150	151	154	157				
STG0016	10	137	140	143	148	151	154	157	160	163	172			
STG0025	4	208	214	215	219									
STI0001	6	194	197	200	203	206	212							
STI0003	11	137	149	150	158	163	167	170	173	176	179	188		
STI0014	6	136	139	142	145	148	151							

Leyenda

Frecuentes
Mod. Frecuente:
Escasos
Raros

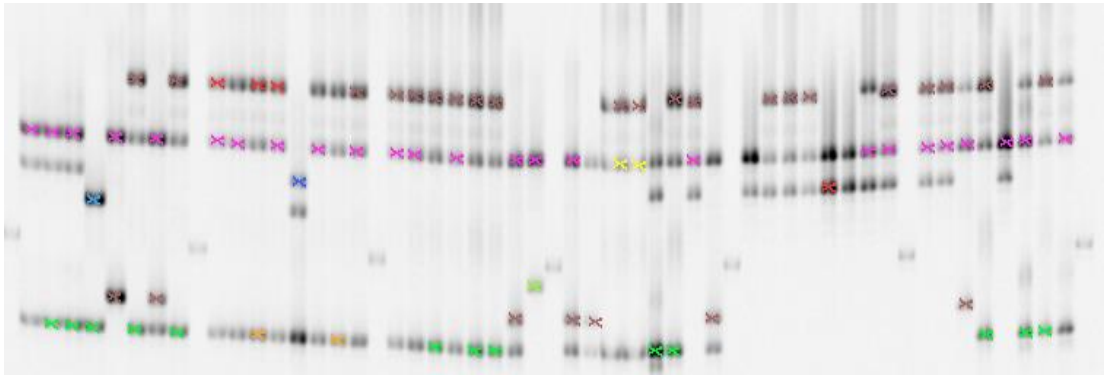


Figura 12. Patrón de alelos del marcador microsatélite STG0016 amplificado en Li-cor, con IRD 800, se observa el polimorfismo de las muestras.

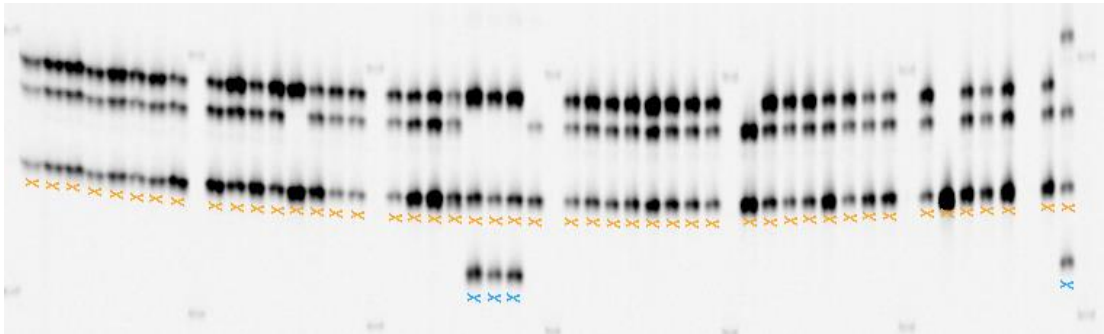


Figura 13. Patrón de alelos del marcador microsatélite STI0003 amplificado en Li-cor, con IRD 700; los alelos se muestran nítidamente siendo fáciles de evaluar.

Tabla 14. Total de alelos encontrados

	Total muestras	Total #alelos	Promedio alelos/23SSR	%
TOTAL	688	188	8.2	100
Yarowilca	237	158	6.9	84.04
Huamalíes	237	172	7.5	91.49
Ambo	214	54	2.3	28.72
Obas	117	143	6.2	76.06
Cahuac	120	145	6.3	77.13
Singa	120	159	6.9	84.57
Llata	117	140	6.1	74.47
Huacar	120	54	2.3	28.72
Tomayquichua	94	54	2.3	28.72
PROMEDIO		115.83		61.61

Se hallaron 188 alelos en las 688 muestras procesadas; así mismo en la provincia de Huamalíes y Yarowilca respectivamente se encontraron la mayor cantidad de alelos, mientras que en Ambo fue menor.

Entre las zonas; en las muestras de Singa se reportaron la mayor cantidad de alelos, seguido por Cahuac, Obas y Llata; sin embargo en las zonas de la provincia de ambo tato Huacar como Tomayquichua solo se encontraron 54 alelos en ambos indicando su nivel de polimorfismo bajo.

4.2.2 Riqueza alélica

Dentro de las 688 muestras de papas kurau analizadas en este estudio se encontró un total de 188 alelos distintos amplificados con los 23 microsátélites.

4.2.2.1 Riqueza alélica por provincia

De las muestras provenientes de las tres provincias estuvieron agrupadas de la siguiente manera:

- ✓ Provincia de Yarowilca: Obas y Cahuac.
- ✓ Provincia de Huamalíes: Singa y Llata.
- ✓ Provincia de Ambo: Huacar y Tomayquichua.

Con este análisis se determinó que la provincia de Huamalíes presentó mayor riqueza alélica, con 172 de los 188 alelos de la muestra total y con un promedio de 7.5 alelos por loci como se muestra en la Tabla 15.

4.2.2.2 Riqueza alélica por zonas

En este caso las muestras tomadas de distintas partes de los distritos fueron denominados zonas. Por lo que para el estudio se agruparon en seis zonas: Obas, Cahuac, Singa, Llata, Huacar y Tomayquichua (Tabla 16).

Se pudo observar que la zona con mayor riqueza alélica se encuentra en la provincia de Huamalíes localizado en el Distrito de Singa; presentó 159 alelos de los 172 alelos encontrados en la provincia y también de los 188 del total.

Presentó un promedio de 6.9 alelos por marcador, a continuación se encuentra las zonas de Cahuac en la Provincia de Yarowilca con 145 y 143 la zona de Obas; para Llata se encontró 140 alelos de 188 del total. Finalmente para las dos zonas de Ambos se determinó 54 alelos del total con un promedio de 2.3 alelos por loci SSR.

Tabla 15. Riqueza alélica por provincia geográfica de procedencia.

SSR_CIP	Total alelos	Yarowilca	Huamalíes	Ambo
STM0037	13	8	13	3
STM1104	7	7	7	2
STM1052	6	5	6	2
STM1106	10	9	8	2
STM5114	8	5	8	1
STM5127	12	11	12	2
STG0010	8	7	8	3
STI0004	7	7	6	2
STI0012	10	8	10	3
STI0030	11	9	10	4
STI0032	8	7	7	3
STI0033	7	7	7	1
STM1064	7	6	6	2
STPoAc58	9	8	8	3
STM1053	6	4	5	3
STM0031	9	6	8	3
STM5121	4	4	4	1
STG0001	9	6	9	2
STG0016	10	10	9	3
STG0025	4	4	3	3
STI0001	6	5	6	1
STI0003	11	10	7	3
STI0014	6	5	5	2
Total	188	158	172	54
Promedio	8.2	6.9	7.5	2.3

Tabla 16. Riqueza alélica para las seis zonas estudiadas

SSR_CIP	Total alelos	Obas	Cahuac	Singa	Llata	Huacar	Tomayquichua
STM0037	13	8	7	12	8	3	3
STM1104	7	6	7	7	7	1	1
STM1052	6	5	5	6	5	2	2
STM1106	10	6	9	7	7	2	2
STM5114	8	4	5	7	4	1	1
STM5127	12	9	10	11	10	3	3
STG0010	8	6	7	8	5	3	3
STI0004	7	7	7	6	6	2	2
STI0012	10	8	7	10	5	3	3
STI0030	11	9	8	7	9	4	4
STI0032	8	7	6	6	7	3	3
STI0033	7	6	6	7	6	1	1
STM1064	7	6	5	5	6	2	2
STPoAc58	9	8	8	6	8	3	3
STM1053	6	4	4	5	3	3	3
STM0031	9	5	6	8	6	3	3
STM5121	4	4	4	4	4	1	1
STG0001	9	6	6	8	9	2	2
STG0016	10	9	8	9	8	3	3
STG0025	4	3	4	3	3	3	3
STI0001	6	5	5	6	5	1	1
STI0003	11	8	7	7	5	3	3
STI0014	6	4	4	4	4	2	2
Total	188	143	145	159	140	54	54
Promedio	8.2	6.2	6.3	6.9	6.1	2.3	2.3

4.2.3 Tipos de alelos encontrados

4.2.3.1 Alelos frecuentes, moderadamente frecuentes, escasos y raros

De los 188 alelos caracterizados, se presentaron 113, 100 y 54 alelos frecuentes para las provincias estudiadas en orden respectivo (Tabla 17), los moderadamente frecuentes se presentaron en mayor porcentaje en la provincia de Huamalíes. Del mismo modo se observaron mayor porcentaje de alelos escasos en la provincia de Huamalíes en la zona de Singa.

Los alelos raros fueron encontrados en mínimo porcentaje en la provincia de Huamalíes y Yarowilca. En las zonas de la provincia de Ambo solo se encontraron alelos frecuentes.

4.2.3.2 Alelos fijos y exclusivos

De este análisis se pudo determinar que la Provincia de Huamalíes cuenta con 2 alelos fijos y 29 alelos exclusivos, mientras Yarowilca solo 15 alelos

exclusivos y 5 fijos. Para Ambo no se hallaron alelos exclusivos, pero si cuenta con 41 alelos fijos (Tabla 18).

Tabla 17. Tipo de alelos encontrados por provincias y zonas

	Total muestras	Total #alelos	Frecuentes >10%	%	Mod. Frecuentes >5%	%	Escasos >1%	%	Raros <1%	%
TOTAL	688	188								
Yarowilca	237	158	113	71.52	17	10.76	17	10.76	11	6.96
Huamalíes	237	172	100	58.14	26	15.12	24	13.95	22	12.79
Ambo	214	54	54	100.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00
PROMEDIO				76.55		8.63		8.24		6.58
Obas	117	143	113	79.02	23	16.08	2	1.40	5	3.50
Cahuac	120	145	95	65.52	12	8.28	27	18.62	11	7.59
Singa	120	159	112	70.44	11	6.92	21	13.21	15	9.43
Llata	117	140	90	64.29	15	10.71	15	10.71	20	14.29
Huacar	120	54	54	100.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00
Tomayquicht	94	54	54	100.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00
PROMEDIO		115.83		86.33		10.17		7.00		10.83
				79.88		7.00		7.32		8.50
										5.80

Tabla 18. Alelos fijos y exclusivos por departamento, provincias y zonas

Nivel Espacial / Población	Número de muestras	Total de alelos	Alelos polimórficos	Alelos fijos	Alelos exclusivos
Departamento					
Huánuco	688	188	186	2	47 *
Provincia					
Yarowilca	237	158	153	5	15
Huamalíes	237	172	170	2	29
Ambo	214	54	13	41	0
Zonas					
Obas (Yarowilca)	117	143	137	6	7
Cahuac (Yarowilca)	120	145	140	5	3
Singa (Huamalíes)	120	159	157	2	18
Llata (Huamalíes)	117	140	133	7	7
Huacar (Ambo)	120	54	4	50	0
Tomayquichua (Ambo)	94	54	10	44	0

Respecto a los alelos fijos o exclusivos para las zonas, se determinó que para Singa se muestra mayor cantidad de alelos exclusivos 18 exclusivos y 2 fijos. Sigue a los valores alelos únicos para Obas (7 y 6), Llata (7 y 7) y Cahuac (3 y 5). Para las zonas de Ambo no se encontraron alelos exclusivos ni fijos.

4.2.4 Heterocigosidad

La heterocigosidad de la muestra total fue calculada tomando como base los 688 genotipos de papas kurau. Los valores más altos fueron obtenidos por los iniciadores STM5127 (0.83), STP0Ac58 (0.82), STI0030 (0.82), STG0016

(0.80) y STM1104 (0.80) respectivamente y el menor valor fue para el ST10033 (0.55) y el valor promedio de He para los 23 marcadores microsatélites fue de 0.72 (anexos II. Tabla 22).

4.2.4.1 Heterocigosidad por provincias y zonas

La heterocigosidad también fue calculada para cada una de las provincias y las zonas colectadas, el mayor promedio de He fue dado para las provincias de Yarowilca y Huamalíes (0.71) y el menor promedio fue para la provincia de Ambo (0.48).



Figura 14. Promedio, Mínimos y Máximos de Heterocigosidad por provincias y zonas.

Las heterocigosidades en las zonas (figura 14) dieron los siguientes resultados: con mayor valor promedio la zona de Obas (0.72), Singa (0.71), Cahuac y Llata con 0.67 y el menor valor promedio se dio para ambas zonas de Ambo, Huacar y Tomayquichua (0.48).

4.2.5 Haplotipos

A partir de la matriz de datos en Excel se identificaron 10 haplotipos para Ambo los cuales se compartían entre sus zonas; en Yarowilca y Huamalíes, se identificaron 100 haplotipos en cada provincia. Sólo 4 haplotipos fueron compartidos entre estas provincias.

Estos resultados evidencian la formación de estructuras en las poblaciones; el primer grupo corresponde a los haplotipos de Ambo, mientras el segundo grupo está conformada por mezclas de genotipos de las provincias de Yarowilca y Huamalíes (figura 15).

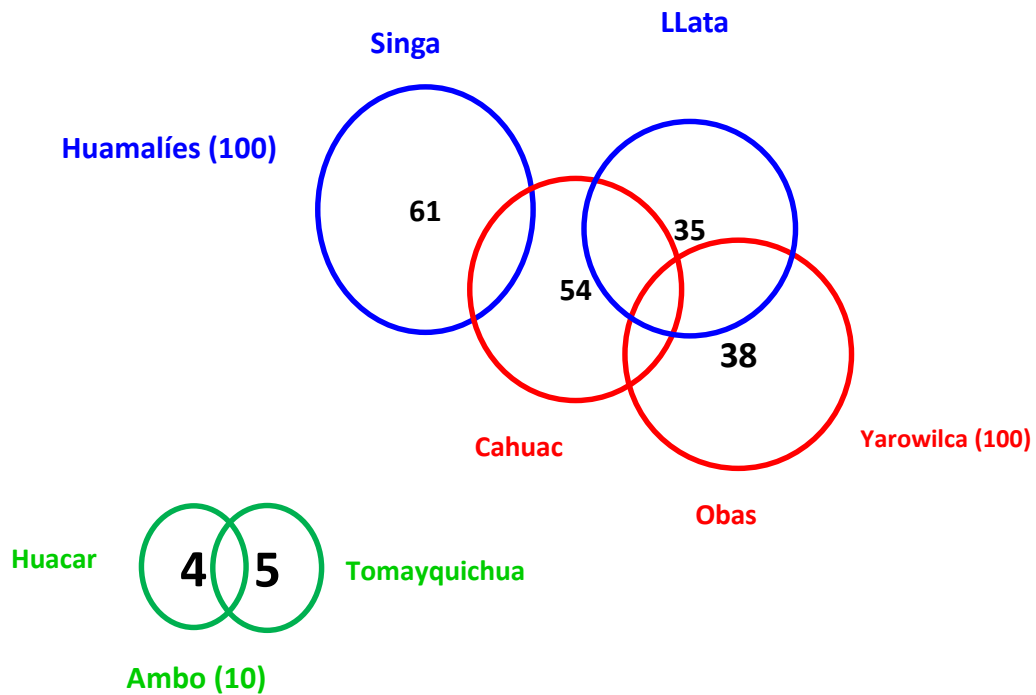


Figura 15. Haplotipos y formación de estructura de poblaciones.

4.2.6 Análisis de varianza molecular (AMOVA)

4.2.6.1 Agrupamiento por provincias y zonas

Se agruparon a los genotipos provenientes de las diferentes zonas de estudio por su ubicación geográfica.

Al realizar el AMOVA de las provincias (Tabla 19) se obtuvo que la mayor variabilidad se dio dentro de las zonas con un 56.97%, mientras que entre las provincias la varianza total fue de 32.10% y entre las zonas dentro de las provincias la variación fue mínima (10.93%); además presentan una diferenciación genética muy grande respecto al valor de F_{st} (0.43).

Tabla 19. Análisis de varianza molecular de provincias y zonas.

Fuentes de varianza	Varianza % total		p	F-estad	Va
Entre Provincias	7.25	32.1	0.063	F _{CT} = 0.321	
Entre zonas/Provincias	2.47	10.93	<0.001	F _{SC} = 0.161	
Dentro de zonas	12.87	56.97	<0.001	F _{ST} = 0.430	

Al hacer el análisis para las zonas (Tabla 20) se determinó que la variación entre las zonas fue de 39.12% y dentro de las zonas un 60.88% de varianza total con un índice de fijación de 0.39 que indica una diferenciación genética muy grande.

Tabla 20. Análisis de varianza molecular de las Zonas.

Fuentes de varianza	Varianza % total		p	F-estad	Va
Entre zonas	8.27	39.12	<0.001	F _{ST} = 0.391	
Dentro de zonas	12.87	60.88			

También se realizó el AMOVA para determinar entre cuáles de las provincias se daba la mayor diferenciación genética, por ende se hizo modificaciones en los agrupamientos; tomando de a pares a las provincias (anexos II. Tabla 23, 20, 21).

Los resultados son las siguientes; variación entre las provincias de Huamalés y Ambo (49.67%), seguido por Yarowilca y Ambo (46.23%) y el de menor variación el par conformado por Huamalés y Yarowilca con (2.69%); con F_{st} de diferenciación genética 0.180 (Huamalés - Yarowilca), 0.523 (Yarowilca - Ambo) y 0.604 (Huamalés - Ambo).

4.2.7 Análisis de agrupamiento

El análisis de agrupamiento de los 688 genotipos de papas kurau se realizó mediante el uso del programa Darwin 6.0. Según la disimilitud calculada a partir del coeficiente de Jaccard, el valor promedio de disimilitud

entre los genotipos muestreados para las provincias de Yarowilca y Huamalíes fue de 0.552 y 0.528 y para Ambo fue de 0.025.

El dendrograma resultante se coloreó siguiendo los criterios de análisis: en base a provincia y zona geográfica de procedencia, así mismo se introdujo datos de un grupo de genotipos silvestres, los cuales son el grupo control. También se utilizaron los datos de 16 genotipos de papas araq colectadas de diferentes departamentos del Perú, que sirvieron de testigos para el análisis.

4.2.7.1 Dendrograma de zonas geográficas

En este caso en el dendrograma se apreció una tendencia de agrupación de los genotipos de las zonas de Huacar y Tomayquichua.

Según la provincia de procedencia, mientras que los genotipos de las zonas de Singa, Llata, Huacar y Tomayquichua no siguen ese patrón sino están dispersas (figura 16).

4.2.7.2 Dendrograma de provincias geográficas

En el dendrograma se apreció que los genotipos de la provincia de Ambo se encuentran agrupada en un solo grupo, mientras que los genotipos de Yarowilca y Huamalíes se encuentran compartidas entre ambas provincias (figura 17).

4.2.8 Análisis de Coordenadas Principales

La figura se obtuvo procesando la matriz de distancias con el programa DarWin 6.0. Se pueden observar las relaciones individuales confirmando los resultados determinados para estructurar a las poblaciones.

En los haplotipos se agruparon por ejes en dos estructuras bien notorias; la primera constituida por los haplotipos para la provincia de Ambo no tan variable, pero completamente distinta a la segunda agrupación que muestra un compartimento de haplotipos por las provincias de Yarowilca y Huamalíes con moderada variabilidad (figura 18).

Huamalíes: Singa, Llata
Yarowilca: Obas, Cahuac
Ambo: Huacar,
Tomayquichua
Grupo control - silvestres

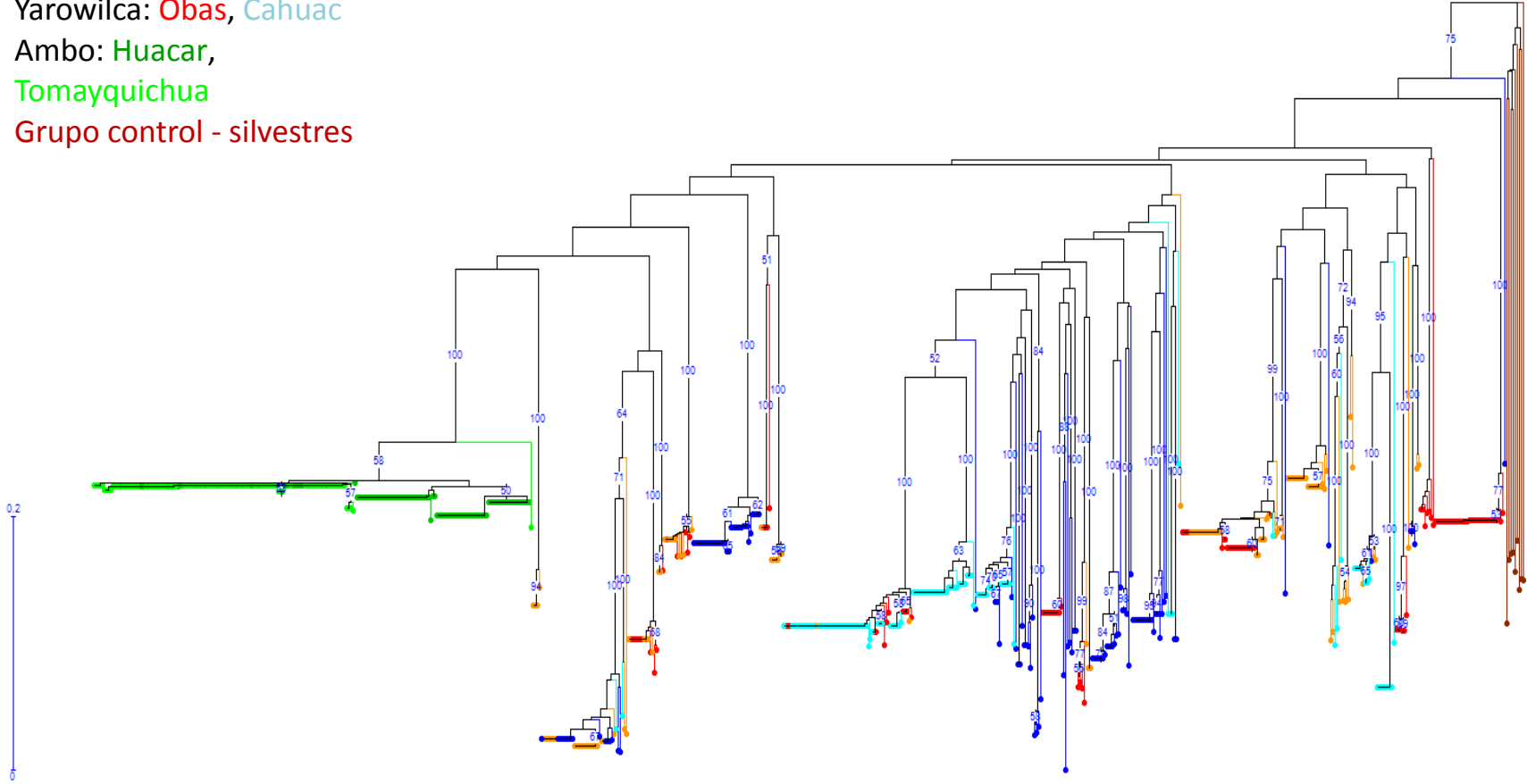


Figura 16. Dendrograma de relación genética entre las zonas.

Huamalíes
Yarowilca
Ambo
Grupo control
Testigos (otros kurau)

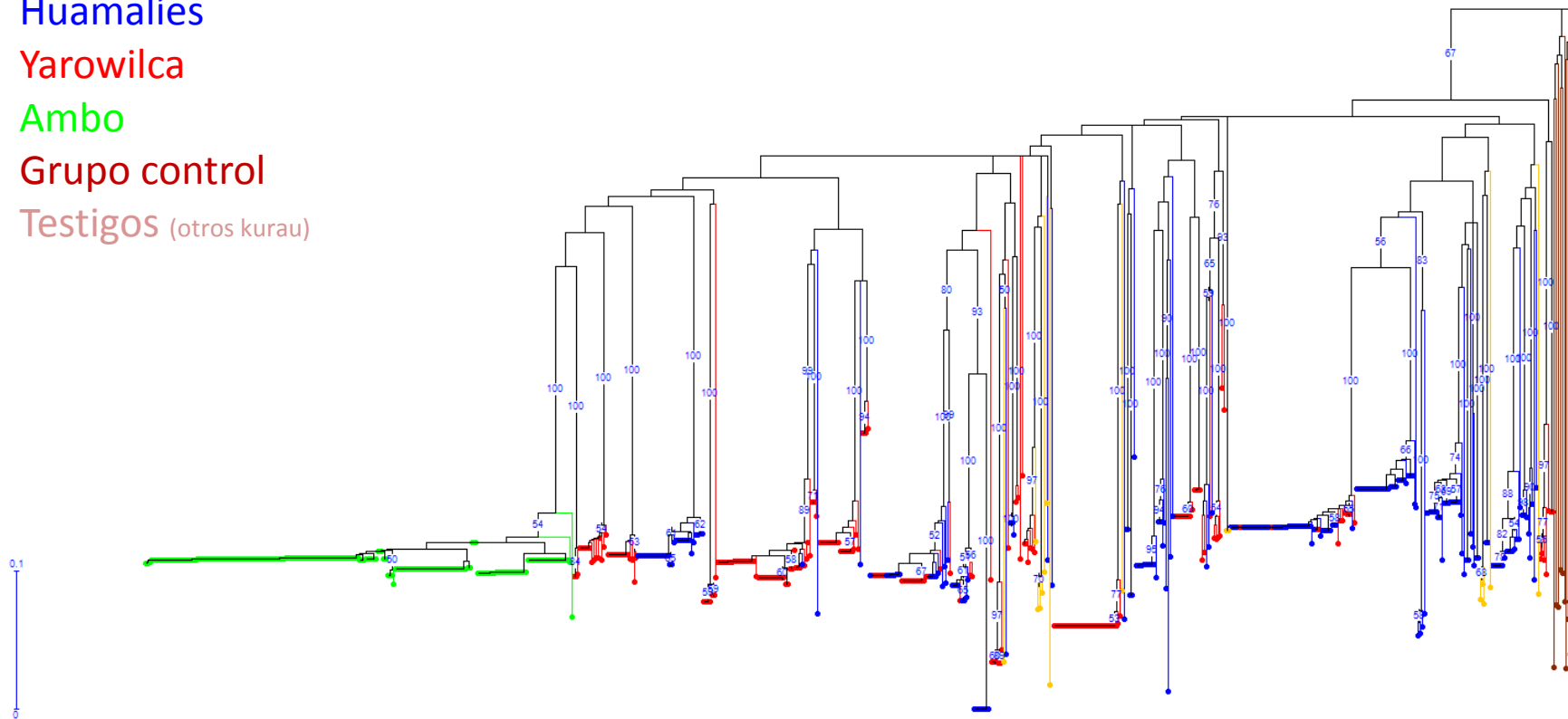


Figura 17. Dendrograma del grupo kurau por las provincias.

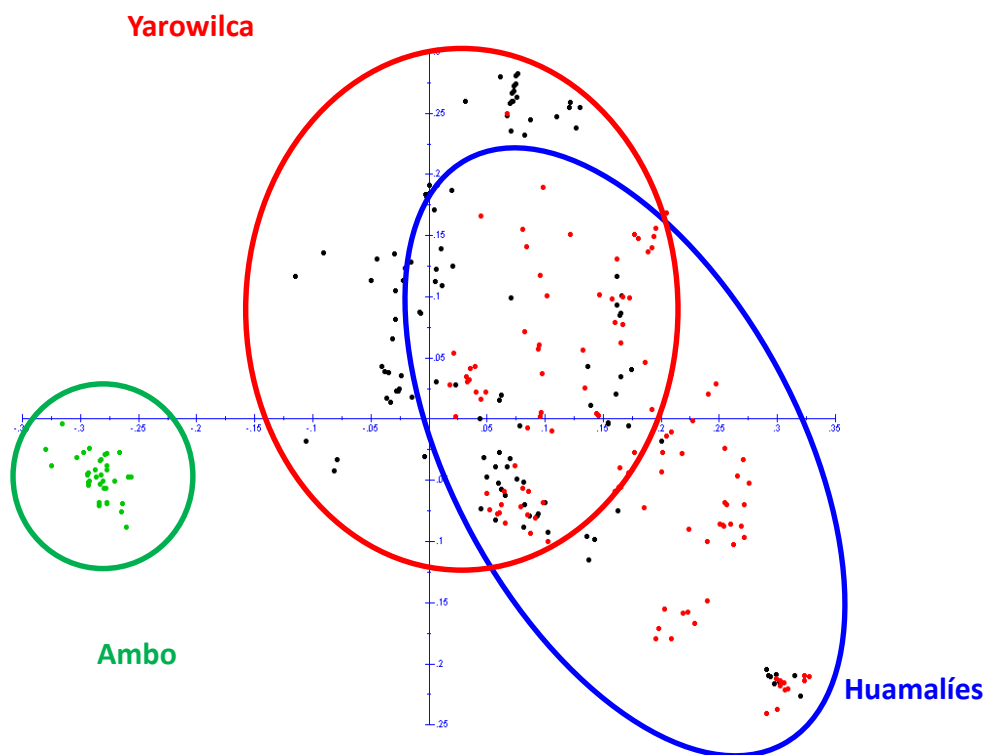


Figura 18. Análisis de Coordenadas Principales (PCoA).

4.2.9 Análisis de Estructura genética

Para este análisis se empleó el programa Structure 2.3 (Pritchard *et al.*, 2000). Con el cual se logró inferir la cantidad de estructuras que conforman las poblaciones.

Para el primer caso (figura 19) se asumió la existencia de 3 poblaciones y los resultados conllevan a que la población de papas kurau está estructurada en dos grupos. Como en análisis anteriores el primer grupo conciso formado por haplotipos de la provincia de Ambo y el otro grupo conformado por mezclas entre haplotipos de las provincias de Yarowilca y Ambo.

En el segundo (figura 20) caso se asumió la existencia de 6 poblaciones y resulta que también se forman dos estructuras, las mismas que ya se mencionaron.

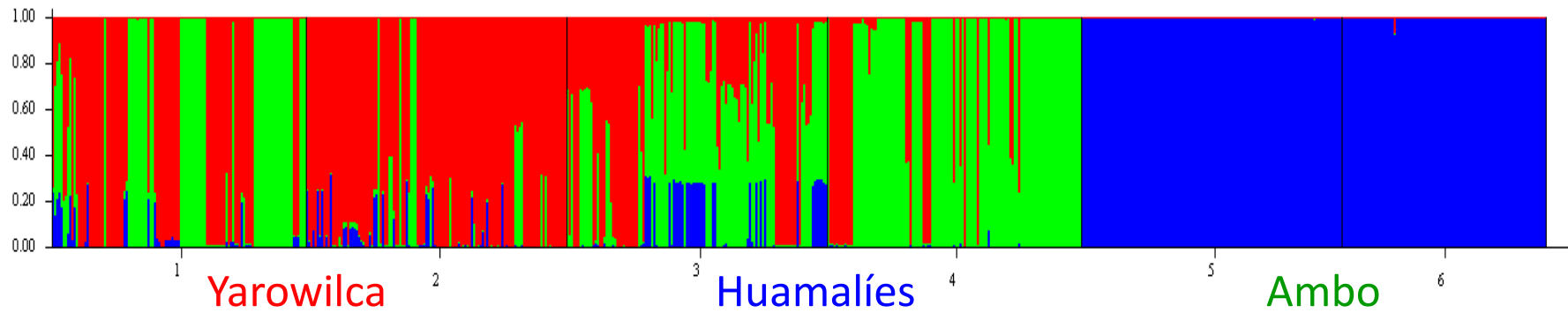


Figura 19. Estructura genética asumiendo que $K=3$.

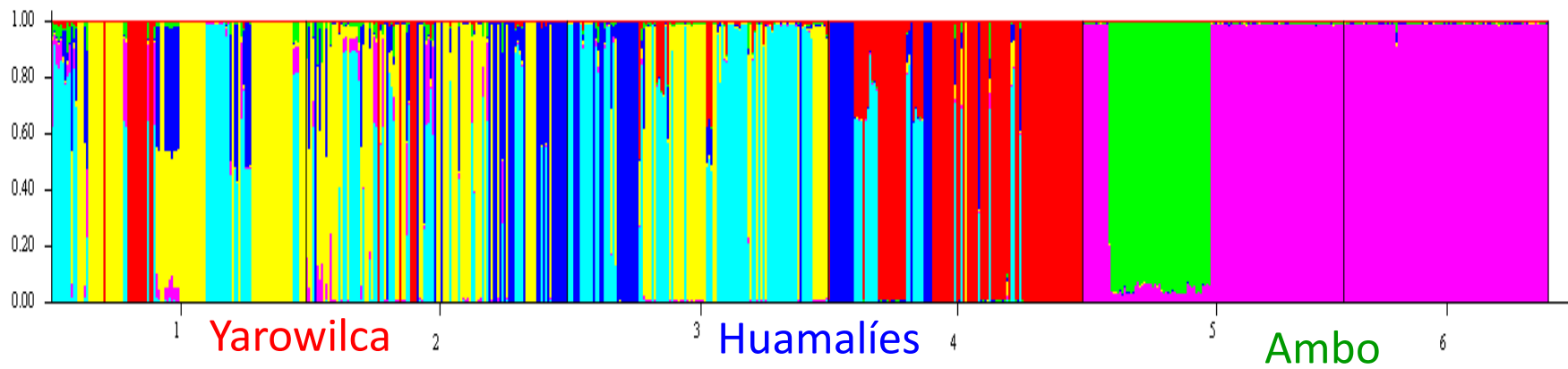


Figura 20. Estructura genética asumiendo que $K=6$.

4.3 Descripción de ecotipos encontrados en las tres provincias

4.3.1 Provincia de Yarowilca:

En Yarowilca; encontramos distintos ecotipos como: puca kurau, yurac kurau, uchcumia, coletto, shawinto, rayin o kita, yana kurau que crecen espontáneamente en su mayoría dentro de los maizales.

El ecotipo que predominó en los Centros poblados de Shunkipampa, Chacabamba fue Shawinto al cual también denominan juito (anexos II. figura 26), esta papa posee las siguientes características; plantas semierectas, flores color lila, tubérculos alargados con piel roja y pulpa pigmentada de color púrpura.

En Santa Rosa de Cáhuac a parte de Shawinto también se encontró la planta de kurau Coletto del cual no se halló tubérculo. En Chupán sólo se encontró puca kurau que responde a la siguiente descripción; planta de tallo semi erecto, flores lilas, tubérculos redondos de piel roja, pulpa blanca con escasos ojos.

4.3.2 Provincia de Huamalíes:

En Huamalíes; se hallaron puca, yana, oque o Martín kurau. Puca kurau presentó las mismas características que las de puca kurau de Yarowilca con la diferencia que los tubérculos eran mucho más grandes (anexos. figura 28).

Martín kurau posee tallo más erecto, flores blancas, tubérculos con piel negra y ojos blancos, pulpa blanca (anexos. figura 27). Yana y Yurac kurau fueron encontradas con tallos erectos, sin flores ni tubérculos. Habas kurau se encontró en estado senescente, posee tubérculos alargados en forma de haba con piel crema y roja intensa (anexo. figura 29B).

4.3.3 Provincia de Ambo:

En Ambo; se encontró puca kurau cuya planta es semi erecta, estolones elongados, tubérculos redondos con piel gruesa roja coriáceos, grandes lenticelas, pulpa semi pigmentada (anexos. figura 30).

Culeto o urampaseccpana se encontraba en crecimiento por lo que no se logró ver las flores. Los tubérculos son alargados, con lenticelas grandes,

con piel gruesa color crema, pulpa crema. Sogochacuan muestra tallos erectos, hojas gruesas, tubérculos blancos con jaspes azules y ojos azules, la pulpa es pigmentada de color azul. Yana kurau presenta tallos semierectos pigmentadas, tubérculos de piel negra con pulpa crema.

V. DISCUSIÓN

El uso marcadores microsatélites resultó de mucho valor, debido a que permitió determinar diferenciación genética existente entre las poblaciones de papas “kurau” entre las 6 zonas y 3 provincias de la Región Huánuco.

El resultado de la aplicación de estos marcadores permitieron agrupar mediante AMOVA, análisis de agrupamiento las diferentes poblaciones por el lugar de procedencia y los haplotipos en comparación a las otras especies cultivadas de papa. El uso de sistemas de información geográfica permitió determinar la distribución espacial de las poblaciones de papas kurau. A continuación, se estarán discutiendo los principales hallazgos de este estudio.

5.1 DISTRIBUCIÓN ESPACIAL

5.1.1 Distanciamiento entre provincias y zonas

De los resultados obtenidos, se puede deducir que no se llegó a cumplir con los distanciamientos propuestos en el proyecto referente a las 12 zonas estudiadas, esto podría haberse debido a la senescencia de plantas en el momento de la colecta y georreferenciación. Es decir, se encontraron campos con las distancias requeridas; sin embargo las plantas no estaban aptas para ser colectadas y su extracción de ADN pudo haber sido en vano.

Entonces, se optó por las parcelas donde aún se encontraban plantas jóvenes (CIP, 2004). De este modo no se cumplieron con los criterios de 20 Km de distanciamiento entre zonas dentro de cada provincia, ni 500 m entre las parcelas. Sin embargo, al ser este trabajo inicial dio bases para definir el correcto cronograma de colecta de muestras aptas para el procesamiento del estudio.

5.1.2 Distribución de genotipos en las provincias

Los mapas de distribución espacial a nivel de provincias muestran con claridad de que el grupo kurau se distribuye por las tres provincias (figura 2)

de Yarowilca, Huamalíes y Ambo, esto da indicios de que pueden distribuirse ampliamente en las provincias aledañas de dichas provincias por la similitud de factores climáticos (Llacsá y Medina, 2007), también por los intercambios de semillas-tubérculos entre los agricultores y por encontrarse a costas de un río (Zimmerer, 1991).

En los últimos años, la erosión de las plantas silvestres, semi-silvestres hasta cultivadas han sido eventos causados por introducción de variedades mejoradas, sobrepastoreos y sobre todo por el cambio climático (en comunicación personal con Ing. Rolando Egúsqüiza). El grupo Araq al cual pertenecen las papas kurau no son ajenos a este problema. No obstante, de los datos obtenidos en campo se pudo afirmar que este grupo de papas semi-silvestres aún persisten en las parcelas de los agricultores con una considerable variabilidad de ecotipos encontrados.

En Ambo con 22 ecotipos, Huamalíes donde se hallaron 14 y en Yarowilca solo 7. Se presume que existen genotipos compartidos que serían resultado de que los agricultores de las diferentes comunidades campesinas suelen nominar 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).

Además, los genotipos pueden haber sido transportados de una comunidad a otra y al realizar el estudio molecular resultan idénticas.

5.1.3 Distribución de genotipos en las zonas

A partir de los datos de georreferenciación se afirma que las papas kurau se distribuyen entre 3268 msnm (Chupán) la zona más baja hasta 3338 msnm (Cahuac) la zona más alta. Mientras que en Huamalíes va desde Chavín (3269 msnm) la zona más baja hasta 3781 msnm (Puños) la zona más alta.

En contraste, Ambo presenta las zonas más bajas entre 2882 msnm (Tomayquichua) y 3336 msnm en San Rafael (anexos.Tabla 21).

5.1.4 Distribución de genotipos dentro de las parcelas

La distribución de las papas kurau dentro de las parcelas no es nada restringida para ninguna de las provincias. Más por el contrario se encontraron plantas de papas kurau en toda la parcela. Así mismo, se observan en los mapas (figuras 17, 18, 19) algunas agrupaciones densas.

5.1.5 Predicción de ocurrencia de papas kurau en la Región Huánuco

A partir de los resultados de MaxEnt se infiere que la ocurrencia de papas del grupo araq en la Región Huánuco se puede dar en 7 de las 11 provincias con un estimado de 50 a 74% de probabilidad. Lo cual es contrastante con las entrevistas realizadas a personas de diferentes provincias sobre referencia y conocimiento sobre estos tubérculos.

Además, en las otras provincias no podrían prosperar las papas kurau ya que Leoncio Prado y Puerto Inca son territorios tropicales, Marañón tiene selva alta y en Huacaybamba podrían ocurrir, pero en mínimas proporciones (figura 10).

5.2 ESTRUCTURA GENÉTICA DE POBLACIONES

No se encontró dificultad alguna en la amplificación de los 23 marcadores microsatélites en las muestras analizadas, a excepción de 32 muestras principalmente de la zona correspondiente a Tomayquichua, debido a problemas de calidad del ADN en la extracción.

En conclusión se analizaron 688 muestras. Los métodos de colección de muestras, envío al laboratorio y extracción de ADN fueron los adecuados (CIP, 2004). La pérdida de las 32 muestras donde no se obtuvo ADN de buena calidad no afectó al análisis de los datos para estructura genética, puesto que la muestra trabajada fue considerable.

5.2.1 Caracterización mediante 23 marcadores microsatélite

El polimorfismo de los marcadores microsatélites del set de PGI (Ghislain *et al.*, 2004), se dieron a conocer en varios estudios en especies de

papa como son *S. stenotum*, *S. goniocalix*, *S. phureja*, *S. ajanhuiri*, *S. curtilobum*, *S. chaucha* y *S. tuberosum* (Ames, 2003; Soto, 2006; de Haan et al., 2010).

Y se pudo contrastar que para el grupo de papas grupos, estos marcadores también muestran alto grado polimórfico ya que el número promedio de alelos por locus fue 8.2 (Tabla 14).

5.2.2 Riqueza alélica

Se logró identificar un total de 188 alelos en las 688 muestras evaluadas con los 23 marcadores microsatélites; 158 alelos corresponden a Provincia de Huamalíes, 172 a Yarowilca y 54 a Ambo (tabla15). De los alelos identificados 29 alelos son exclusivos para la Provincia de Huamalíes, 15 para Yarowilca y Ambo no tuvo este tipo de alelos el cual los muestra muy pobre en comparación a los que sí presentan.

La zona con mayor número de alelos exclusivos fue Singa con 18, seguido por Obas y Llata que presentaron 7 y Cahuac solo 3. Así mismo, se anuncian 41 alelos fijos para Ambo, 5 para Yarowilca y 2 alelos fijos para Huamalíes (Tabla 17). Se concluye que no se encontraron grandes diferencias entre Yarowilca y Huamalíes, pero sí entre cada una de estas con la provincia de Ambo.

En las zonas, Huacar presentó 50 alelos fijos siendo el de mayor número, seguido por Tomayquichua con 44 y en bajos números Llata, Obas, Cahuac y Singa (7, 6, 5 y 2) respectivamente. De estos resultados se puede afirmar que con los alelos exclusivos de evidencia las zonas de la provincia de Huamalíes son las que presentan mayor riqueza alélica en comparación a las zonas de Yarowilca que si bien poseen riqueza alélica, pero es en menor cantidad.

Las zonas de Ambo poseen mayor número de alelos comunes y ninguno de exclusividad por lo tanto es pobre en variabilidad de alelos. No obstante estos resultados pueden resultar diferentes en investigaciones

futuras, puesto que los genotipos colectados para este estudio fueron poco diversos (en su mayoría puca kurau), frente a los que se logró observar en campo (total 22 ecotipos), pero que no se colectaron por no estar aptas en el momento.

Estudios anteriores, donde emplearon parte de los SSR utilizados para este trabajo, reportaron 166 alelos en las siguientes cantidades 72 alelos comunes y 28 alelos exclusivos para diversas poblaciones de papas nativas provenientes de 5 departamentos del Perú (Soto, 2006) y 181 alelos en poblaciones nativas de papas de Huancavelica (de Haan *et al.*, 2010).

Los alelos frecuentes se deben al acervo genético compartido por los ecotipos de las tres provincias geográficamente separadas, mientras los alelos exclusivos se deberían al acervo genético característico de cada provincia. Se reporta que el 76.55%, es decir más de la mitad de alelos son frecuentes entre las provincias estudiadas (Tabla 16), lo cual evidencia la distribución de dichos alelos entre las zonas geográficas, también se puede destacar que los alelos raros se encuentran en mayor número en la provincia más alejada (Yarowilca, 22 alelos de 172), así mismo existen ecotipos con alelos exclusivos.

Se presume que la riqueza alélica de papas kurau en estas zonas de estudio se debería a la diversidad existente de papas nativas. 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).

Lo resaltante de este estudio es que son poblaciones naturales, se les compara con las papas nativas por pertenecer a una de las subsp. andigena al cual pertenecen.

5.2.3 Heterocigosidad

La heterocigosidad calculada en el presente estudio permitió estimar la variabilidad genética existente en las poblaciones del grupo kurau estudiadas.

La heterocigosidad se calculó utilizando las frecuencias de los alelos moleculares y no las frecuencias de los alelos genéticos, por lo que la heterocigosidad podría estar sub-estimada. Lo expuesto anteriormente es una desventaja de los marcadores microsatélites cuando se evalúa un organismo poliploide y no se logra determinar el dosaje genético.

Las papas “kurau” pertenecen a *S. andigena* subsp. *andigena* (Ochoa, 1999), por lo que son organismos tetraploides. A pesar de no haber realizado conteo de cromosomas o citometría de flujo para corroborar el nivel de ploidía, el 73% de los individuos presentaron 2 o 3 alelos microsatélites característico de individuos tetraploides (Spooner *et al.*, 2007). A lo anterior se suma que todos los clústeres de papa “kurau” tienen relación con clústeres de *S. andigena* subsp. *andigena*.

La Heterosigosidad del total de muestras tuvo un valor promedio de 0.72 con el cual confirma el alto grado de variabilidad en las poblaciones estudiadas (Grover *et al.*, 2009). Para las provincias de Yarowilca y Huamalíes la heterocigosidad fue 0.71 en ambas y 0.48 para Ambo (figura 15). Estos datos son indicios de que las dos provincias iniciales presentan mayor variación genética (Grover *et al.*, 2009), no siendo así en el caso de Ambo donde las frecuencias de sus alelos son más fijos y nada variables.

En las zonas se da el caso de que Obas presenta Mayor He (0.72), seguido por Singa (0.71) superior a Cahuac y Llata (0.67). Las zonas de Huacar y tomayquichua indicaron un bajo valor de He. Estos datos se respaldan con los resultados de anteriores de riqueza alélica demostrándose que en las provincias de Huamalíes y Yarowilca se presentan mayor variación genética (Grover *et al.*, 2009) que en Ambo.

5.2.4 Haplotipos

De acuerdo a los resultados; la población de papas kurau estudiada presenta haplotipos.

En vista de que en Yarowilca y Huamalíes (100 haplotipos cada una) comparten 4 haplotipos (figura 11), muestran que su reproducción es clonal, pero también evidencian la reproducción sexual. Sin embargo, Ambo con 10 haplotipos no comparte con ninguna provincia más, lo que significa que es una población muy diferente, que se reproducen de forma clonal, posiblemente a través de sus estolones y tubérculos.

5.2.5 Análisis de Variancia Molecular (AMOVA)

El AMOVA (Excoffier, *et al.* 1992) sirvió para determinar la existencia de estructura genética en diferentes niveles o sub subpoblaciones. En el caso de papas nativas de Haan *et al.*, (2010) utilizaron dicho análisis para su estudio en poblaciones del departamento de Huancavelica reportando que existe mayor variación dentro de las sub poblaciones (98.94%), mientras que la variación entre las poblaciones y entre subpoblaciones dentro de poblaciones fue de 0.19 % y 0.87 % respectivamente.

En esta investigación se obtuvieron resultados diferentes al de de Haan *et al.*, (2010); ya que el mayor porcentaje de variación también se dio dentro de las zonas (56.97%), en aproximadamente 7% más de la mitad. Lo que significa que fueron producto de las distintas frecuencias alélicas existentes entre las zonas y de los haplotipos que comparten entre ellas. Además, las poblaciones colectadas para este trabajo fueron naturales mas no cultivadas. de Haan *et al.* 2010; emplearon territorios más extensos y distanciados.

Sin embargo, el índice de fijación ($F_{st} = 0.43$) de acuerdo a la escala de valores para la interpretación da a entender que estas poblaciones presentan diferenciación genética muy grande.

Al realizar el AMOVA más fino entre pares de provincias se muestra claramente que entre el par Huamalíes y Yarowilca los mayores porcentajes de variación se da dentro de las parcelas (81.98%) y entre zonas dentro de provincias (15.40 %) resultando ser altamente significativas (anexos. Tabla 20). Entre tanto la fuente de variación entre provincias (2.62%) suele ser no significativo respecto a la variación genética. Lo que no ocurre en el par

formado por Yarowilca y Ambo debido a que existe variabilidad tanto dentro de las zonas, como también entre las provincias (anexos. Tabla 23). NO obstante, entre las provincias de Huamalíes y Ambo (anexos. Tabla 24) se da la mayor variación (49.67%).

Estos resultados son evidentes si se analizan la composición de los ecotipos colectados para cada provincia. Siendo así, Huamalíes y Yarowilca estuvieron compuestas por genotipos diferentes y algunas similares, en cambio Ambo estuvo compuesta por limitado número de ecotipos (1-2 por zona, con predominio de puca kurau). Por lo tanto, al ser las muestras heterogéneas en las primeras provincias y homogénea en Ambo que involucran a las distintas frecuencias alélicas y alelos exclusivos permiten variaciones considerables en comparaciones entre cada una de las dos primeras con la tercera (Ambo) y limitadas entre Yarowilca y Huamalíes.

5.2.6 Análisis de agrupamiento

En el análisis de agrupamiento de muestras se observó que el índice de disimilaridad o coeficiente de Jaccar para Yarowilca (0.552) y Huamalíes (0.528) presentaron relativa muestra de variación indicando que las muestras de las poblaciones fueron ligeramente heterogéneas, es decir que son genéticamente más distintas que similares. Mientras el índice de disimilaridad para Ambo (0.025) indica con certeza que las muestras colectadas pertenecen a poblaciones genéticamente homogéneas.

Se puede afirmar que los 23 marcadores microsatélites fueron suficientes para diferenciar a las poblaciones por provincias y por zonas. Estos resultados se contrastan con el dendrograma (figura 17) donde se aprecia agrupación de Ambo como un grupo y Yarowilca con Huamalíes como otro grupo debido a que comparten algunos genotipos. Así mismo, se añade un dendrograma (figura 16) donde la agrupación de las zonas evidencia lo afirmado.

Además, se concuerda con Ochoa (1999) y constató que las papas kurau o kurao del grupo Araq se distribuyen ampliamente en el dendrograma

dentro de la especie *S. tuberosum* subsp. *andigena*, comprobándose así su identidad taxonómica al menos para este grupo (anexos. Figura 31).

5.2.7 Análisis de coordenadas principales y estructura genética de las poblaciones

Este análisis fortalece la certeza de los resultados obtenidos del AMOVA y el análisis de agrupamiento por haplotipos (figura 15). De forma similar, el análisis ejecutado con el programa Structure que muestra si las poblaciones en estudio están estructuradas, proporcionó evidencia de que dichas poblaciones están estructuradas en dos grupos completamente diferentes, el primero está conformado por Ambo y el segundo por las provincias de Yarowilca y Huamalíes, los cuales presentarían mezclas de muestras entre estas; a ello se debe su agrupación en el mismo grupo (figuras 29, 30).

VI. CONCLUSIONES

La presente investigación concluye que:

- ✓ Hay presencia de papas kurau desde los 2 599 msnm hasta los 3 868 msnm en zonas maiceras y de otros cultivos de la Región Huánuco.
- ✓ El modelo de predicción sugiere que existen otras zonas donde se pueden encontrar papas kurau dentro de la Región Huánuco.
- ✓ Los 23 marcadores microsatélites utilizados en nuestro estudio han demostrado ser útiles para la evaluación genética molecular de las muestras de papas kurau o kurao (*Solanum tuberosum* subsp. *andigena*).
- ✓ El alto número de alelos compartidos entre las provincias Yarowilca y Huamalíes permite concluir que existe un acervo genético común ampliamente distribuido.
- ✓ Existe variabilidad genética variante de acuerdo a las provincias, una con base genética estrecha (Ambo) y otras con amplia base genética aunque emparentada (Huamalíes y Yarowilca).
- ✓ Las provincias de Huamalíes y Yarowilca presentaron alta variación genética. Y Ambo no presentó variación genética, sin embargo en completamente diferente.
- ✓ La población total de papas kurau está estructurada en dos grupos.
- ✓ Debido a la alta diversidad se debería conservar y estudiar este acervo genético secundario de papa en todas las zonas estudiadas y en aquellas con probable presencia de “papas kurau”.

VII. RECOMENDACIONES

Se recomienda de realizar trabajos de investigación en:

- Caracterización morfológica *in situ* de ecotipos de papas kurau en las zonas que resultaron tener mayor número de estructuras de genética poblacional.
- Caracterización citológica de papas kurau de los genotipos que resultaron interesantes en esta investigación.
- Diversidad genética de las papas kurau en Huánuco y el Perú.
- Colección de ecotipos de papas kurau en las provincias restantes de la Región de Huánuco.
- Estudio molecular de genotipos colectados en las provincias restantes de la Región Huánuco.
- Etnobotánica de las papas kurau en la Región Huánuco.
- Colección, mapeo y etnobotánica de papas araq en el Perú.
- Se recomienda utilizar el Sistema de Información Geográfica (SIG) como una herramienta para el estudio de diferentes temas agrícolas.

VIII. LITERATURA CITADA

- Acuña, C. 2012. Marcadores moleculares y su aplicación a la genómica forestal. Instituto de Biotecnología – INTA Castelar. 75 p.
- Agencia Agraria de Noticias. 2013. Consultado el 01 de agosto del 2013. [En línea] Disponible en: <http://www.agraria.pe/noticias/peru-es-el-primer-productor-de-papa-en-sudamerica>.
- Álvarez, M. 2001. Oportunidad para el desarrollo de productos de papas nativas en el Perú. En Revista Latinoamericana de la Papa. Vol especial. P 58-79. Perú.
- Ames, MI. 2003. Validación de la selección de la colección núcleo de *Solanum tuberosum* subsp. *andigena* mediante el uso de Marcadores Microsatélites. Tesis para optar el título profesional de Biólogo. UNFV. Lima – Peru. 96 p.
- Ashkenazi, V., Chani, E., Lavi, U., Levy, D., Hillel, J., & Veilleux, R. E. (2001). Development of microsatellite markers in potato and their use in phylogenetic and fingerprinting analyses. *Genome*, 44(1), 50 –62. doi:10.1139/gen-44-1-50
- Azofeifa, A. 2006. Uso de marcadores moleculares en plantas: Aplicaciones en frutales del trópico.
- Borda, N. 2008. La papa un alimento básico. Uruguay. 11 p. Consultado el 01 de abril del 2013. [En línea] Disponible en: <http://www.rapaluguay.org/transgenicos/Papa/Papa.pdf>
- Bouno, M. 2012. Tecnología del ADN recombinante. 15 p. Consultado el 4 de Abril del 2013. [En línea] Disponible en: <http://www.slideshare.net/mpbu3n0/pasos-para-pcr>
- Centro Internacional de la Papa (CIP). 2004. Protocolos de Laboratorio de Biotecnología Aplicada. Tipificación genética. Herrera, Ma del R. y

- Ghislain (eds). División de mejoramiento de germoplasma y de cultivos. Manual de capacitación. 3ra. Ed. Lima-Perú.
- Centro Internacional de la Papa (CIP). 2008. Potato Genetic Identity (PGI): Protocols and reference ladders. Herrera, Ma del R. y Ghislain (eds). División de mejoramiento de germoplasma y de cultivos. Manual de capacitación. 3ra. Ed. Lima-Perú.
- Centro Internacional de la Papa (CIP). 2011. La papa y la seguridad alimentaria, situación actual y desafíos para la innovación. IV Congreso Nacional de la Papa. Guaranda – Ecuador. 38 p.
- Condori, JM. 2003. Selección de la colección núcleo de *solanum tuberosum* subsp. *andigena* basada en marcadores microsatélites. Tesis para optar el título profesional de biólogo. UNALM. Lima – Perú. 107 p.
- Contreras M., A. 2008. Historia y origen de la papa cultivada – influencia de la papa americana en el mejoramiento de especies a nivel mundial. 39 vistas. Universidad Austral de Chile. Consultado el 7 de Abril del 2013. [En línea] Disponible en: <http://.papaslatinas.org/alap/Nuevos%20archivos/CONFERENCIAS/contreras.pdf>
- Cribb, P.J. and J. G. Hawkes. 1986. Experimental evidence for the origin of *S. tuberosum* subsp. *andigena*. **En:** Solanaceae: Biology and systematic. W.G. D'Arcy (ed). Columbia University press. New York
- Cruz, P. 2003. Identificación, caracterización y herencia de microsatélites y su aplicación como marcadores moleculares en programa de mejoramiento de camarón blanco *Litopenaeus vannamei*. La Paz - Bolivia. 160 p.
- de Haan S, Núñez J, Bonierbale M, & Ghislain M. 2010. Multilevel agrobiodiversity and conservation of andean potatoes in central Perú. *Mountain Research and Development* 30(3):222-231.

- de Haan, Stef. 2006. Catálogo de variedades de papas nativas de Huancavelica - Perú. 199 p.
- Edward S. 2010. Lugar de Origen. En: Biodiversidad en América Latina y El Caribe. Págs. 12 a 18.
- Egúsquiza, R., Medina, T., Retamozo, L., Ramirez, D., Ojeda, M., Cornejo, C., Mendoza, Y., Torres, J., Velásquez, D., Cruz, A., Machuca, N. y Fernández, A. 2009. Mecanismos de sostenibilidad de la agrobiodiversidad vegetal nativa en comunidades tradicionales alto andinas de Cajamarca y Huánuco. 69 p.
- Escobar, F., G. Hunter, I. Bishop and A. Zenger, 2008. Introduction to GIS. Department of Geomatics, The University of Melbourne, USA.
- Espinoza, L. 2007. Guía práctica sobre la técnica PCR. 23 p. Consultado el 21 de noviembre del 2012. [En línea] Disponible en: <http://www2.ine.gob.mx/publicaciones/libros/530/cap17.pdf>
- ESRI. 2011. ArcGIS Desktop: Release 10. Environmental Systems Research Institute.
- Estrada, R. 2000. La Biodiversidad en el mejoramiento genético de la papa.
- Excoffier, L. and H.E.L. Lischer. 2010. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol. Eco. Res.* 10: 564-567
- Excoffier, L., Smouse, P., and Quattro, J. 1992 Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131:479-491.

- Feingold S, Lloyd J, Norero N, Bonierbale M and Lorenzen J. 2005. Mapping and characterization of new EST derived microsatellites for potato (*Solanum tuberosum* L.). *Theor. Appl. Genet.*, 111: 456-466.
- Ferreyra, ME y Gratapaglia, D. 1998. Introducción al uso de marcadores moleculares en el análisis genético. Embrapa Ed. Brasilia, Brasil. 220 p.
- Freeland J.R. 2005. *Molecular Ecology*. John Wiley and Sons. pg 51 – 53.
- Freeland, J. 2005. The evolution of population biology: past, present and future. *Journal of Biogeography*, 32: 2039–2040. doi: 10.1111/j.1365-2699.2005.01363.
- Ghislain M, Spooner D, Rodríguez F, Villamón F, Núñez J, Vásquez C, Waugh R, Bonierbale M. 2004. Selection of highly informative and user-friendly microsatellites (SSRs) for genotyping of cultivated potato. En: *Theor Appl Genet* (2004) 108:881–890.
- Ghislain, M., Núñez, J., Rosario Herrera, M., Pignataro, J., Guzman, F., Bonierbale, M., & Spooner, D. M. 2009. Robust and highly informative microsatellite-based genetic identity kit for potato. En: *Mol Breeding* (2009) 23:377–388.
- Ghislain, M., Kreuze, J., Scurrah, M., Arcos, J. y Buijs, J. 2008. La biotecnología moderna para el control del estrés biótico y su impacto ambiental en papa. ALAP - 2008. Argentina. 34 págs.
- Ghislain, M., Rodríguez F., Villamón F., Núñez J., Waugh, R. & Bonierbale1, M. 2001. Establishment of microsatellite assays for potato genetic identification In: *Scientist and farmer: partners in research for the 21th century*. Technical Progress Report (1999-2000). International Potato Center, Lima, Peru. Pag: 167-174.

- Gilles, B., Pham, J.L., Deu, M., Vigouroux, Y., Sagnard, F., Mariac, C., Kapran, I., Mamadou, A., Gérard, B., Ndjeunga, J. and Chanterreau, J. 2009. Changes in the diversity and geographic distribution of cultivated millet (*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.) and sorghum (K (L.) Moench) varieties in Niger between 1976 and 2003. **En:** Genet Resour Crop Evol (2009) 56:223–236. 14 p.
- Goldstein, B. D. and Schlotterer, C. 1999. Microsatellites evolution and applications. Oxford University Press, New York, 352pp.
- Gómez R. 2000. Guía para las Caracterizaciones Morfológicas Básicas en Colecciones de Papas Nativas. Centro Internacional de la papa (CIP), Lima, Perú. 27 p.
- Grun, P. 1990. The evolution of cultivated potato. En P.K. Bretting [ed.], New perspectives on the origin and evolution of New World domesticated plants. Economic Botany 44: 39-55.
- Hawkes J. G. 1990. The potato: Evolution, bioversity and genetic resources. Belhaven Press, London. 259 p.
- Hawkes J.G. 1956. A revision of the tuber-bearing solanums. Scottish Plant Breed. Stat. Ann. Rep. p. 37- 109.
- Hawkes J.G. 1962. The origin of *Solanum juzepczukii* Buk and *Solanum curtilobum* Juz. Et Buk. Z. Pflanzenzucht.47: 1-14.
- Hawkes J.G. 1994. Origins of cultivated Potatoes and Species Relationships. In: Potato Genetics. CAB International University Press UK Cambridge.
- Hijmans, 2002. Diversity and ecology of the potato: The use of spatial analysis in crop science. Wageningen University. Thesis (Ph.D.). Wageningen (Netherlands). 211 p.

- Hokanson SC, Szewc-McFadden AK, Lamboy WF, McFerson JR. 1998. Microsatellites (SSR) markers reveal genetic identities, genetic diversity and relationships in a *Malus x domestica* Borkh. Core subset collection. *Theoretical and applied genetics* 97: 671-683.
- Huff D.R., Peakall R., Smouse P.E. 1993. RAPD variation within and among natural populations of outcrossing buffalograss [*Buchloe dactyloides* (Nutt.) Engelm]. *Theor. Appl. Genet.*, 86: 927-934.
- INIA y FAO. 2008. Perú: Segundo informe sobre el estado de los recursos fitogenéticos para la alimentación y la agricultura. Cap 1: Estado de la Diversidad. P 23. Perú. 93 p.
- IPGRI y Cornell University. 2004. Análisis de la diversidad genética utilizando datos de marcadores moleculares: módulo de aprendizaje. 47 p.
- Jarne, P. and Lagoda L. 1996. Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends Ecology and Evolution* 11:424–429.
- Karp, A. & Edwards, K. J. 1995. Techniques for the analysis, characterization and conservation of plant genetic resources. In: *Molecular Genetic techniques for plant genetic resources. Report of IPGRI workshop 9 - 11.* W.G.Ayad, T. Hodgkin, A. Jaradat & V.R. Rao, (Eds). October 1995. Rome, Italy. p: 3- 22
- Khurana, SM, Minjas, JS y Pandey, SK. 2003. The potato production and utilization in sub-tropics. Metha Ed. Nueva Delhi, India. 445 p.
- Li-cor Bioscens. 2005. Saga GT Manual tutorial. 104 p.
- Llacsá, J. y Medina, T. 2007. Mapas temáticos. Distribución de chacras. INIA. Lima, Perú. 92 p.
- Martinez, CP. 2013. Progreso en el mejoramiento genético asistido por marcadores moleculares. CYAT programa de Arroz. 48 p.

- Mendoza, H. A. y Haynes, F. L. 1974. Genetic relationship among potato cultivars grown in the United States. Hort. Science 9:328-330.
- Mengoni A., Gori A., Bazzicalupo M. 2000a. The use of RAPD and SSR (microsatellite) variation for assessing genetic relationships among tetraploid alfalfa. Plant Breeding, 119: 311-318.
- Milbourne D, Meyer R, Bradshaw JE, Baird E, Bonar N, Provan J, Powell W and Waugh R. 1997. Comparison of PCR-based marker systems for the analysis of genetic relationships in cultivated potato. Molecular Breeding 3:127–136.
- Milbourne D, Meyer RC, Collins AJ, Ramsay LD, Gebhardt C and Waugh R. 1998. Isolation, characterization and mapping of simple sequence repeat loci in potato. Mol. Gen. Genet., 259: 233-245.
- Molina, C. 2003. Global Positioning System. 85 p.
- Mullis, KB. 1990. The unusual origin of the polymerase Chain Reaction. En: Sci Am. 1990 Apr; 262(4):56-61, 64-5.
- Nagamine, Y. y M. Higuchi. 2001. Genetic distance and classification of domestic animals using genetic markers. Journal of Animal Breeding and Genetics. 118: 101-109.
- Nei, M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. Proceedings of the national academy of sciences USA, 70:3321-3323
- Ochoa, C. Roca, W. Centeno, R. Ghislain, M. 2008. En: La biotecnología y su aporte al cultivo de la papa: evidencias sobre su origen y diversidad, y papa: y perspectivas para el futuro. Santiago-Chile. Págs. 43: 9,11.
- Ochoa, C.M. 1999. Las papas de Sudamérica: Perú (Parte I). CIP. Allen Press. Kansas, USA. 1036 p

- Ochoa, CM. 2001. Las papas de Sudamérica: Bolivia. En: Ochoa, CM. (Ed.). VII Serie tuberosa (28) *Solanum sparsipilum*. La paz, Bolivia. P 535: 294.
- Ochoa, CM. 2003. Las papas del Perú. Lima, Pe. CIP, UNALM, COSUDE. 184 p.
- Organización de la Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO). 1988. Geographic Information System. FAO. Roma.
- Organización de las Naciones Unidas. 2008. La papa y la biodiversidad. Consultado el 7 de abril del 2013. [En línea] Disponible en: http://www.onu.org.pe/Upload/infocus/papa/aip2008_biodiversidad.pdf
- Paffetti D., Daguin F., Fancelli S., Gnocchi S., Lippi F., Scotti C., Bazzicalupo M. 1998. Influence of plant genotype on the selection of nodulating *Sinorhizobium meliloti* strains by *Medicago sativa*. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 73: 3-8.
- Paredes, C. 2010. Importancia de la papa en la seguridad alimentaria Del Perú y del mundo. INIA. Perú. 45 diapositivas. Consultado el 15 de abril del 2013. [En línea] Disponible en: <http://www.inia.gob.pe/notas/nota0622/Presentacion%20ALAP.pdf>
- Pérez, AM. 2013. Reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction, PCR). 10 p. Consultado el 7 de abril del 2013. [En línea] Disponible en: <http://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/10700/Reacci%C3%B3n%20en%20cadena%20de%20la%20polimerasa.pdf>
- Perrier X., Jacquemoud-Collet J.P. 2006. DARwin software <http://darwin.cirad.fr/darwin>
- Phillips, S.J., Anderson, R.P. & Schapire, R.E. 2006. Maximum entropy modeling of species geographic distributions. *Ecological Modelling*, 190, 231–259.

- Pritchard, J. K., Stephens, M., and Donnelly, P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155:945–959.
- Programa Cooperativo para el Desarrollo Tecnológico Agropecuario del Cono Sur (PROCISUR). 1995. Documento marco del Subprograma Recursos genéticos – PRPCISUR. Goedert, C. (Eds). Uruguay. PROINPA / CIA / CIP. Bolivia.
- Provan, J., Powell, W., Waugh, R. 1996. Microsatellites analysis of relationships within cultivated potato (*Solanum tuberosum*). *Theoretical and Applied Genetics*. Springer – Verlag. 92: 1078 – 1084.
- Quirós, C. E, R. Ortega, L. van Raarnsdonk, M. Herrera-Montoya, P. Cisneros, E. Schmidt, and S. B. Brush. 1992. Increase of potato genetic resources in their center of diversity: The role of natural outcrossing and selection by the Andean farmer. *Genetic Resources and Crop Evolution* 39: 107-113.
- Raker, C. and Spooner, D. 2002. The Chilean tetraploid cultivated potato, *Solanum tuberosum*, is distinct from the Andean populations; microsatellite data. *Crop sci* 42: 1451-1458.
- Reid A, Hof L, Esselink D and Vosman B. 2009. Potato cultivar genome analysis. *Methods Mol. Biol.*, 508: 295- 308.
- Rentaría, M. 2007. Breve revisión de los marcadores moleculares. Cap. 18. Pp 541. **En:** *Ecología molecular*. Mexico. 608 p.
- Ritter, E., J. Ruiz de Galarreta, L. Barandalla, R. López, M. Huarte, S. Capezzio, X. Cuesta, J. Rivadeneira, F. Vilaró, J. Gabriel, M. Scurrah, R. Canto, W. Amoros, A. Forbes, M. Bonierbale, 2010. Papas Nativas - Un cultivo con potencial de alto valor añadido para la agricultura sostenible. *Revista Latinoamericana de la papa* Vol 15 N° 1. pag 58-60. ISSN-1019-66092009.

- Roca, W. Centeno, R. Ghislain, M. 2008. En: La biotecnología y su aporte al cultivo de la papa: evidencias sobre su origen y diversidad, y papa: y perspectivas para el futuro. Santiago-Chile. Págs. 43: 9, 11.
- Rochambeau, H., F. Fournet-Hanocq and J. Vu Tien Khang. 2000. Measuring and managing genetic variability in small populations. *Ann. Zootech.* 49: 77-93.
- Rodríguez, F., Folch, C., Orena, S., Kido, A., Peña, A., Kalazich, J. y Rojas, J.S. 2012. Avances de la caracterización de las papas nativas de Chile. XXV ALAP y XIV ENB 2012. 17 -20 de Setiembre.
- Saiki, R. K; D.H Gelfand, S. Stoffel; S. Scharf; R. Higuchi; G.T. Horn; K.B Mullis & H.A Erlich. 1988. Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487 - 491.
- Saitou N, Nei M. 1987. *Mol Biol Evol* 4:406–425.
- Seminario, J. 2004. Origen de las raíces andinas (1). En: J. Seminario (ed.). Raíces andinas. Serie: la domesticación de raíces y tubérculos. La vegecultura. Universidad de Cajamarca, Centro internacional de la Papa, Agencia Suiza para el Desarrollo y la Cooperación. Lima, Perú. p 10.
- Sevilla, R. & Holle, M. 2004. Recursos Genéticos Vegetales. Ed. Torre Azul. Lima.
- Soto, J. 2006. 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. Lima, Perú.
- Spooner DM, Salas A. 2006. In Handbook of Potato Production, Improvement, and Post-Harvest Management (Haworth, Binghamton, NY), pp 1–39.

- Spooner, D., Núñez, J. and Rodriguez, F. 2005. 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* 110: 1020-1026.
- Spooner, D.M., Salas L, A., Huaman Z. and Hijmans R.J. 1999. Wild Potato Collecting Expedition in Southern Peru (Departments of Apurimac, Arequipa, Cusco, Moquegua, Puno, Tacna) in 1998: Taxonomy and New Genetic Resources. *Amer. J. Potato Res.* 76: 103-119.
- Weir, B. S. 1996. Genetic data analysis II. Methods for discrete population genetic data. Sinauer Associates, INC. Publishers, Sunderland, Massachusetts 150-156; 209-211.
- Zimmerer, KS. 1991. The regional biogeography of native potato cultivars in highland Perú. *Journal of Biogeography* 18:165–178.
- Zorrilla, C. 2006. Diversidad genética de cultivares nativos de papas amargas y ocas provenientes de Puno. Tesis para optar el título de Biólogo. Lima-Perú. UNALM. 206 p.

IX. ANEXOS

I. Provincias con sus respectivas zonas de estudio

Total	Provincias	zonas	Parcelas/zona	ADN/SIG	Altitud (msnm)
1	Yarowilca	Chupán	1	SIG	3243
2	Yarowilca	Chupán	2	SIG	3353
3	Yarowilca	Chupán	3	SIG	3474
4	Yarowilca	Chupán	4	SIG	3463
5	Yarowilca	Chupán	5	SIG	3303
6	Yarowilca	Chupán	6	SIG	3245
7	Yarowilca	Chupán	7	SIG	3186
8	Yarowilca	Chupán	8	SIG	3107
9	Yarowilca	Chupán	9	SIG	3042
10	Yarowilca	Obas	1	ADN/SIG	3513
11	Yarowilca	Obas	2	ADN/SIG	3484
12	Yarowilca	Obas	3	ADN/SIG	3429
13	Yarowilca	Obas	4	ADN/SIG	3449
14	Yarowilca	Obas	5	ADN/SIG	3441
15	Yarowilca	Obas	6	ADN/SIG	3106
16	Yarowilca	Obas	7	ADN/SIG	3075
17	Yarowilca	Obas	8	ADN/SIG	3055
18	Yarowilca	Obas	9	ADN/SIG	3073
19	Yarowilca	Obas	10	ADN/SIG	3157
20	Yarowilca	Chacabamba	1	SIG	3450
21	Yarowilca	Chacabamba	2	SIG	3429
22	Yarowilca	Chacabamba	3	SIG	3427
23	Yarowilca	Chacabamba	5	SIG	3262
24	Yarowilca	Chacabamba	4	SIG	3181
25	Yarowilca	Chacabamba	6	SIG	3208
26	Yarowilca	Chacabamba	7	SIG	3191
27	Yarowilca	Chacabamba	8	SIG	3197
28	Yarowilca	Chacabamba	9	SIG	3192
29	Yarowilca	Chacabamba	10	SIG	3178
30	Yarowilca	Cachuac	1	ADN/SIG	3357
31	Yarowilca	Cachuac	2	ADN/SIG	3356
32	Yarowilca	Cachuac	3	ADN/SIG	3395
33	Yarowilca	Cachuac	4	ADN/SIG	3464
34	Yarowilca	Cachuac	5	ADN/SIG	3503
35	Yarowilca	Cachuac	6	ADN/SIG	3477
36	Yarowilca	Cachuac	7	ADN/SIG	3428
37	Yarowilca	Cachuac	8	ADN/SIG	3126
38	Yarowilca	Cachuac	9	ADN/SIG	3140
39	Yarowilca	Cachuac	10	ADN/SIG	3138
40	Huamalíes	Chavín de Pariarca	1	SIG	3509
41	Huamalíes	Chavín de Pariarca	2	SIG	3234
42	Huamalíes	Chavín de Pariarca	3	SIG	3186
43	Huamalíes	Chavín de Pariarca	4	SIG	3104
44	Huamalíes	Chavín de Pariarca	5	SIG	3115
45	Huamalíes	Chavín de Pariarca	6	SIG	3248
46	Huamalíes	Chavín de Pariarca	7	SIG	3404
47	Huamalíes	Chavín de Pariarca	8	SIG	3413
48	Huamalíes	Chavín de Pariarca	9	SIG	3370
49	Huamalíes	Chavín de Pariarca	10	SIG	3106
50	Huamalíes	Singa	1	ADN/SIG	3738
51	Huamalíes	Singa	2	ADN/SIG	3766
52	Huamalíes	Singa	3	ADN/SIG	3747
53	Huamalíes	Singa	4	ADN/SIG	3325
54	Huamalíes	Singa	5	ADN/SIG	3069
55	Huamalíes	Singa	6	ADN/SIG	3208

Total	Provincias	zonas	Parcelas/zona	ADN/SIG	Altitud
56	Huamalíes	Singa	7	ADN/SIG	3436
57	Huamalíes	Singa	8	ADN/SIG	3427
58	Huamalíes	Singa	9	ADN/SIG	3410
59	Huamalíes	Singa	10	ADN/SIG	3569
60	Huamalíes	Llata	1	ADN/SIG	3640
61	Huamalíes	Llata	2	ADN/SIG	3520
62	Huamalíes	Llata	3	ADN/SIG	3576
63	Huamalíes	Llata	4	ADN/SIG	3636
64	Huamalíes	Llata	5	ADN/SIG	3461
65	Huamalíes	Llata	6	ADN/SIG	3698
66	Huamalíes	Llata	7	ADN/SIG	3658
67	Huamalíes	Llata	8	ADN/SIG	3650
68	Huamalíes	Llata	9	ADN/SIG	3640
69	Huamalíes	Llata	10	ADN/SIG	3423
70	Huamalíes	Puños	1	SIG	3754
71	Huamalíes	Puños	2	SIG	3780
72	Huamalíes	Puños	3	SIG	3823
73	Huamalíes	Puños	4	SIG	3775
74	Huamalíes	Puños	5	SIG	3721
75	Huamalíes	Puños	6	SIG	3720
76	Huamalíes	Puños	7	SIG	3702
77	Huamalíes	Puños	8	SIG	3851
78	Huamalíes	Puños	9	SIG	3868
79	Huamalíes	Puños	10	SIG	3818
80	Ambo	San Rafael	1	SIG	3202
81	Ambo	San Rafael	2	SIG	3436
82	Ambo	San Rafael	3	SIG	3484
83	Ambo	San Rafael	4	SIG	3356
84	Ambo	San Rafael	5	SIG	3342
85	Ambo	San Rafael	6	SIG	3306
86	Ambo	San Rafael	7	SIG	3451
87	Ambo	San Rafael	8	SIG	3305
88	Ambo	San Rafael	9	SIG	3293
89	Ambo	San Rafael	10	SIG	3289
90	Ambo	Huacar	1	ADN/SIG	3077
91	Ambo	Huacar	2	ADN/SIG	3080
92	Ambo	Huacar	3	ADN/SIG	3141
93	Ambo	Huacar	4	ADN/SIG	3007
94	Ambo	Huacar	5	ADN/SIG	2930
95	Ambo	Huacar	6	ADN/SIG	2909
96	Ambo	Huacar	7	ADN/SIG	2890
97	Ambo	Huacar	8	ADN/SIG	2878
98	Ambo	Huacar	9	ADN/SIG	2907
99	Ambo	Huacar	10	ADN/SIG	2599
100	Ambo	Colpas	1	SIG	3162
101	Ambo	Colpas	2	SIG	3026
102	Ambo	Colpas	3	SIG	3023
103	Ambo	Colpas	4	SIG	2760
104	Ambo	Colpas	5	SIG	2806
105	Ambo	Colpas	6	SIG	2893
106	Ambo	Colpas	7	SIG	2917
107	Ambo	Colpas	8	SIG	3447
108	Ambo	Colpas	9	SIG	3449
109	Ambo	Colpas	10	SIG	3017
110	Ambo	Tomayquichua	1	ADN/SIG	2882
111	Ambo	Tomayquichua	2	ADN/SIG	2958
112	Ambo	Tomayquichua	3	ADN/SIG	2957
113	Ambo	Tomayquichua	4	ADN/SIG	2958
114	Ambo	Tomayquichua	5	ADN/SIG	2895
115	Ambo	Tomayquichua	6	ADN/SIG	2791
116	Ambo	Tomayquichua	7	ADN/SIG	2830
117	Ambo	Tomayquichua	8	ADN/SIG	3043
118	Ambo	Tomayquichua	9	ADN/SIG	2877
119	Ambo	Tomayquichua	10	ADN/SIG	2629

II. Protocolo de extracción a pequeña escala

1. Cortar 0.20 – 0.22 g aproximadamente de tejido vegetal y colocar en tubos eppendorf de 2ml con esferas (billas o perlas) de cerámica esterilizados.
2. En el siguiente paso agregar 750 ul de buffer de extracción CTAB 2X y 2 ul de mercaptoetanol. Luego, colocar los arandelas de caucho al borde de cada tubo y poner a moler por 20 segundos en la trituradora (Savant fast prep) dos veces.
3. Obtenido la trituración se homogeniza el tejido y se lleva a incubar las muestras a 65 °C por 45 minutos. Después de 5 minutos del inicio de la incubación se agitan las muestras, por lo menos 3 veces. Agitar 2 veces cada 20 minutos. Pasado el tiempo se retiran las muestras de baño maría a temperatura ambiente. Ya fría se agrega 750 ul de cloroformo: alcohol Isoamílico 24:1, se agita hasta homogenizar el contenido para centrifugar a 14 000 rpm por 5 minutos.
4. Luego, se Transfiere el sobrenadante (aprox. 650 ul) a tubo eppendorf esterilizados de 1.5 ml donde se agrega 75 ul de CTAB 10X (A 65 °C) y agita hasta homogenizar. Para continuar con el procedimiento se agrega 650 ul cloroformo: alcohol isoamilico (24:1) y se agita hasta homogenizar completamente para centrifugar a 14 00 rpm por 5 minutos. El sobrenadante de este se transfiere (aprox. 550 ul) a tubos de 1.5 ml esterilizados. Este paso determina la calidad del DNA. Ya que no deben parar residuos vegetales.
5. Se continúa agregando 500 ul de Isopropanol frío y se agita suavemente por espacio de 10 segundos. Se lleva a incubar a -20 °C por 30 minutos. En este momento se puede detener el procedimiento hasta el próximo día, sino seguir con el centrifugado a 14 00 rpm por 20 minutos. Dejar decantar el Isopropanol con cuidado de no perder el pellet y dejar los tubos invertidos por espacio de 1 minuto sobre papel toalla. Entonces, se agrega 1 ml de etanol 70% y se tratar de desprender el pellet de la base del tubo. Centrifugar a 14 00 rpm por 15 minutos.

6. Nuevamente se decanta con cuidado de no perder el pellet y deja los tubos invertidos por espacio de 30 segundos sobre papel toalla. Se agrega 1 ml de etanol al 90 % y se desprende el pellet de la base del tubo para centrifugar a 14 00 rpm por 10 minutos. Este paso se repite nuevamente y se deja secar invirtiendo el tubo sobre papel toalla por 30 minutos. Finalmente, se re-suspende cada uno de los pellets en 75 ul de solución de T₁₀E1. Y son almacenados a 4 °C para sus posteriores usos en estudio.

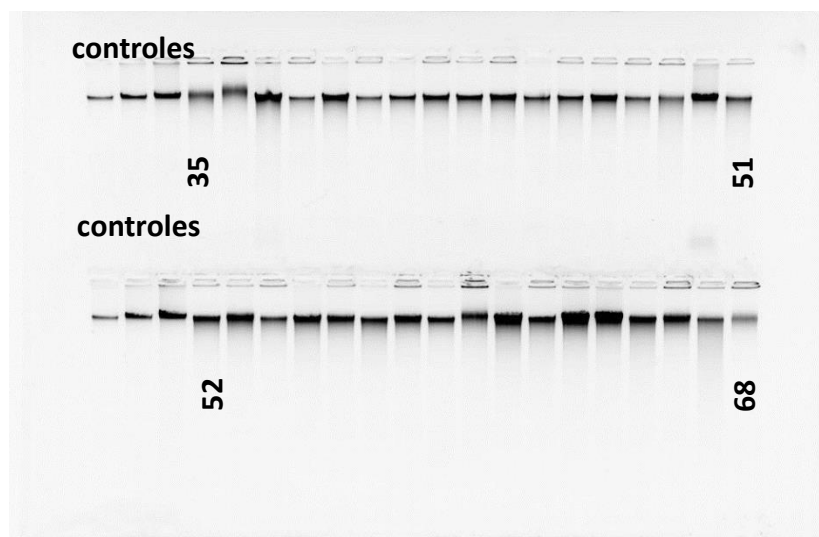


Figura 21. Electroforesis en geles de agarosa de muestras para calidad y cuantificación de ADN. Muestras del 35-68 (Obas - Yarowilca) teniendo como controles a *S. tuberosum* en diferentes cantidades 100, 200 y 400ul de ADN.

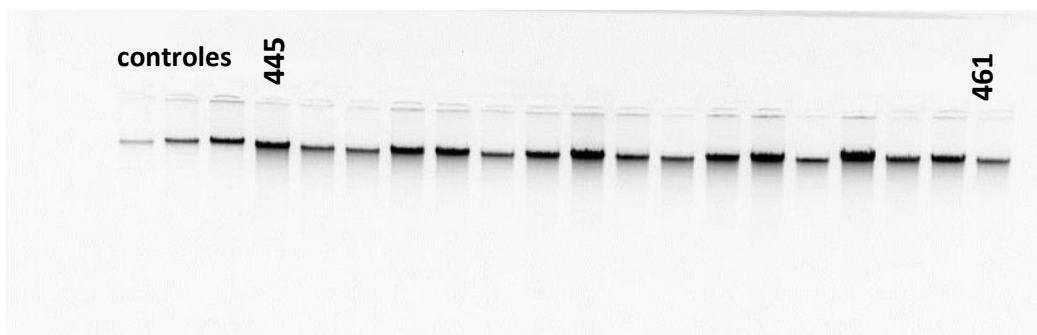


Figura 22. Electroforesis en geles de agarosa de muestras para calidad y cuantificación de ADN. Muestras del 445 al 461 (Llata-Huamalíes) teniendo como controles a *S. tuberosum* en diferentes cantidades 100, 200 y 400ul de ADN.

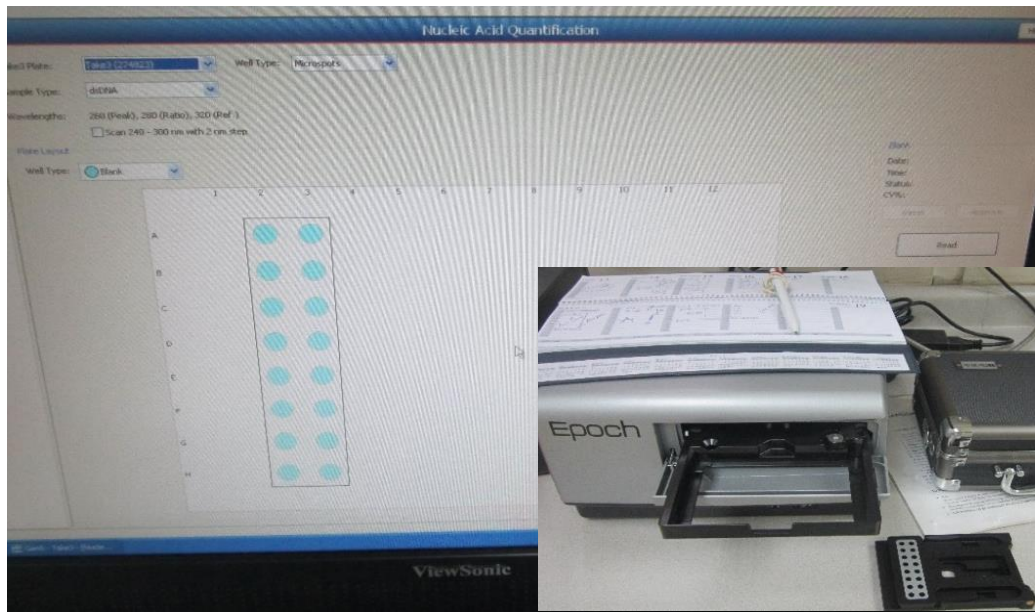


Figura 23. Software Gen5 y equipo Epoch para cuantificar alelos microsatélites.

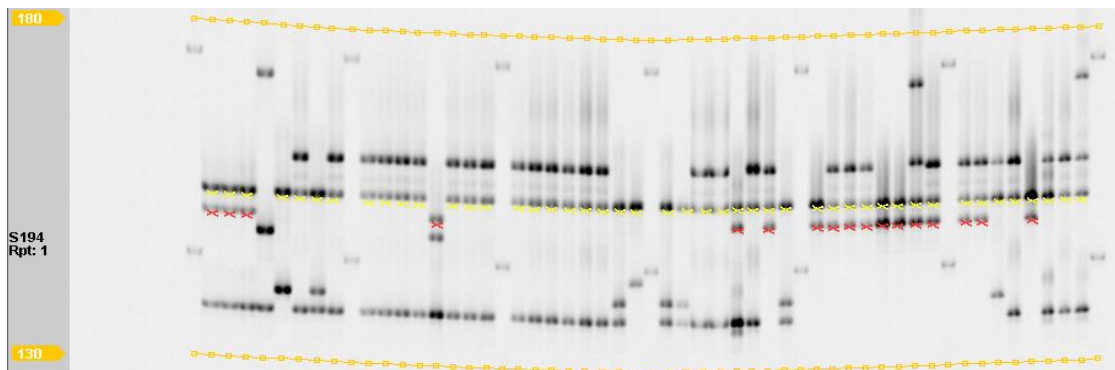


Figura 24. Patrón de bandas obtenidas luego de amplificar con el par de iniciadores S194.

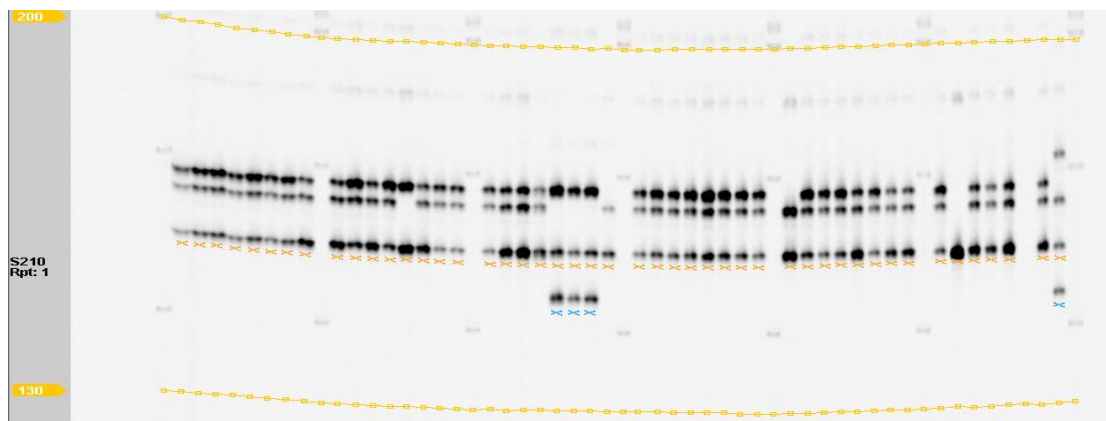


Figura 25. Patrón de bandas obtenidas luego de amplificar con el par de iniciadores S210.



Figura 26. Ecotipo coletto (sup. Izq.) uchcumia (medio izq.) Shawinto o juito (inf. Izq y der.) de la provincia de Yarowilca.



Figura 26. Ecotipo ogue kurau o Martin kurao de San Pedro del Marañón - Singa (Huamalíes).



Figura 28. Ecotipo puca kurau o kurao rojo de Llata (Huamalíes).

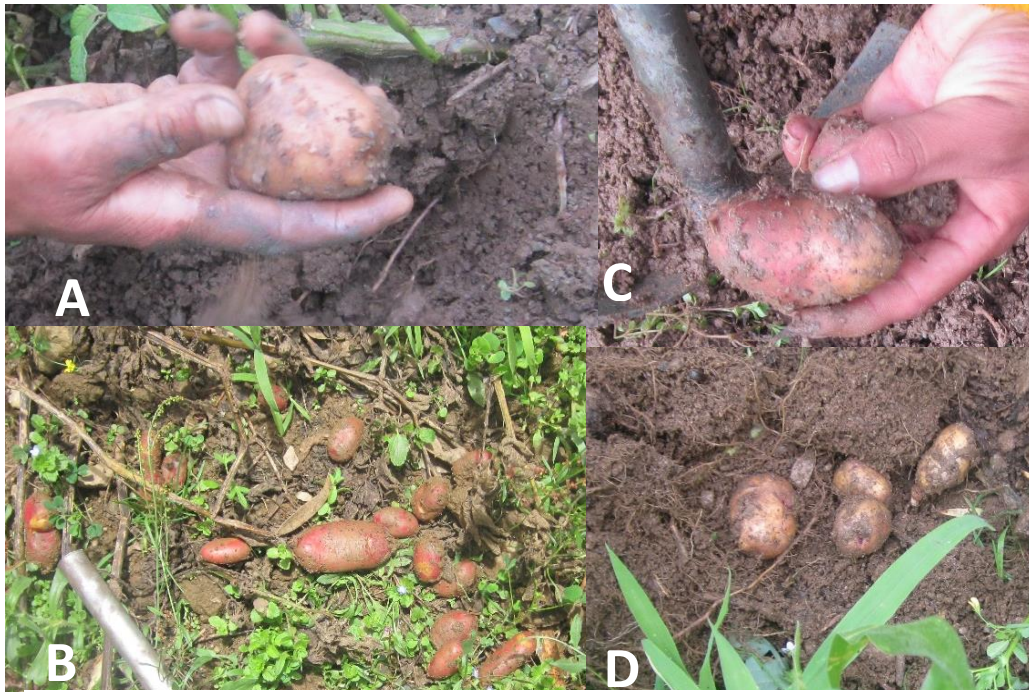


Figura 29. Ecotipo kurao ambarina (A), habas kurao (B), Shojti (C) y (D) kurao blanco de Singa (Huamalíes).



Figura 30. Ecotipo puca kurau (Muestras ADN) (A), kurao (B), Sogochacuan (C) (Ambo).

Tabla 21. Resumen de las zonas de estudio y las provincias.

Zonas	Altitud/zona	Altitud/provincia	mín	máx
Chupán	3268			
Obas	3278			
Chacabamba	3272			
Cáhuac	3338			
Promedio		3290	3042	3513
Chavín	3269			
Singa	3470			
Llata	3590			
Puños	3781			
Promedio		3527	3069	3868
Huácar	2942			
San Rafael	3346			
Colpas	3050			
Tomayquichua	2882			
Promedio		3055	2599	3484
Región			2599	3868

Tabla 22. Hereocigosidad esperadas, promedios, mínimos y máximos por marcador microsatélite para provincias y zonas.

SSR		Total	Provincia 1	Provincia 2	Provincia 3	Yarowilca		Huamalíes		Ambo	
CIP	Lab.	Huánuco (688)	Yarowilca	Huamalíes	Ambo	Obas	Cahuac	Singa	Llata	Huacar	Tomayquichua
STM0037	S042	0.759	0.805	0.742	0.668	0.817	0.781	0.774	0.671	0.668	0.668
STM1104	S081	0.800	0.808	0.828	0.000	0.809	0.796	0.818	0.790	0.000	0.000
STM1052	S084	0.685	0.675	0.767	0.501	0.656	0.677	0.786	0.679	0.501	0.501
STM1106	S101	0.714	0.596	0.738	0.501	0.546	0.626	0.682	0.676	0.501	0.501
STM5114	S114	0.646	0.674	0.692	0.000	0.686	0.652	0.735	0.612	0.000	0.000
STM5127	S127	0.828	0.806	0.848	0.668	0.820	0.762	0.843	0.813	0.668	0.668
STG0010	S188	0.752	0.729	0.740	0.668	0.716	0.732	0.707	0.727	0.668	0.668
STI0004	S211	0.728	0.745	0.742	0.501	0.766	0.689	0.726	0.702	0.501	0.501
STI0012	S214	0.751	0.817	0.721	0.668	0.837	0.760	0.758	0.645	0.668	0.668
STI0030	S224	0.822	0.835	0.811	0.751	0.838	0.814	0.803	0.785	0.751	0.751
STI0032	S225	0.769	0.815	0.690	0.661	0.804	0.814	0.729	0.628	0.634	0.668
STI0033	S226	0.548	0.652	0.602	0.000	0.674	0.595	0.609	0.578	0.000	0.000
STM1064	S027	0.604	0.523	0.579	0.501	0.641	0.251	0.483	0.578	0.501	0.501
STPoAc58	S029	0.823	0.784	0.751	0.668	0.813	0.737	0.704	0.735	0.668	0.668
STM1053	S036	0.680	0.665	0.687	0.668	0.630	0.663	0.699	0.667	0.668	0.668
STM0031	S052	0.768	0.744	0.764	0.668	0.725	0.745	0.799	0.703	0.668	0.668
STM5121	S121	0.692	0.646	0.725	0.000	0.720	0.438	0.696	0.718	0.000	0.000
STG0001	S179	0.697	0.752	0.745	0.501	0.735	0.754	0.742	0.697	0.501	0.501
STG0016	S194	0.802	0.806	0.806	0.668	0.824	0.767	0.814	0.784	0.668	0.668
STG0025	S203	0.581	0.321	0.175	0.668	0.354	0.284	0.201	0.146	0.668	0.668
STI0001	S209	0.656	0.666	0.733	0.000	0.666	0.654	0.729	0.714	0.000	0.000
STI0003	S210	0.764	0.788	0.765	0.668	0.795	0.759	0.782	0.722	0.668	0.668
STI0014	S216	0.600	0.649	0.605	0.501	0.655	0.622	0.601	0.608	0.501	0.501
PROMEDIO		0.716	0.709	0.707	0.482	0.719	0.668	0.705	0.669	0.481	0.483
Max		0.682	0.659	0.657	0.372	0.673	0.608	0.647	0.615	0.371	0.373
Min		0.750	0.759	0.757	0.592	0.765	0.728	0.763	0.723	0.591	0.593

Tabla 23. Análisis de varianza molecular para Huamalíes y Yarowilca.

<u>Fuentes de Varianza</u>	<u>% Varianza</u>	<u>p</u>	<u>F-estadísticos</u>
Entre Provincias	2.62	0.336	FCT = 0.026
Entre zonas/Provincias	15.40	<0.001	FSC = 0.158
Dentro de zonas	81.98	<0.001	FST = 0.180

Tabla 24. Análisis de varianza molecular para Yarowilca y Ambo.

<u>Fuentes de Varianza</u>	<u>% Varianza</u>	<u>p</u>	<u>F-estadísticos</u>
Entre Provincias	46.23	0.330	FCT = 0.462
Entre zonas/Provincias	6.04	<0.001	FSC = 0.112
Dentro de zonas	47.73	<0.001	FST = 0.523

Tabla 25. Análisis de varianza molecular para Huamalíes y Ambo.

<u>Fuentes de Varianza</u>	<u>% Varianza</u>	<u>p</u>	<u>F-estadísticos</u>
Entre Provincias	49.67	0.325	FCT = 0.497
Entre zonas/Provincias	10.78	<0.001	FSC = 0.214
Dentro de zonas	39.55	<0.001	FST = 0.604

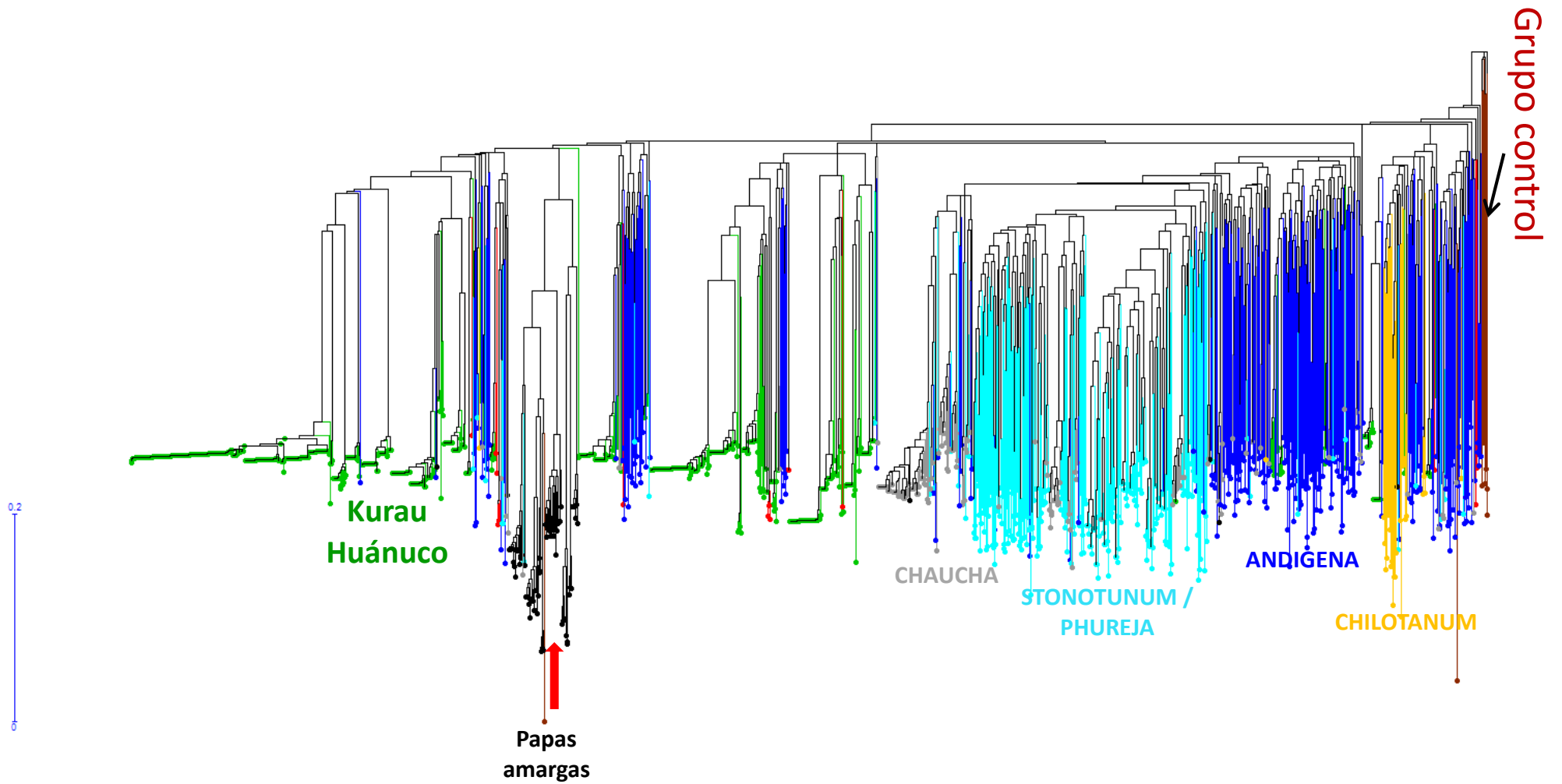


Figura 31. Dendrograma del grupo Kurau procedentes de Huánuco con las otras especies de papas cultivadas y un grupo control (Silvestres).