

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN SIMÓN
FACULTAD DE CIENCIAS AGRÍCOLAS PECUARIAS
FORESTALES Y VETERINARIA
“DR. MARTÍN CÁRDENAS”
DIRECCIÓN DE POSGRADO



CONSTRUCCIÓN DE UNA COLECCIÓN NÚCLEO DE
Solanum tuberosum L. subsp. *andigena* Hawkes CONSERVADA EN EL
BANCO NACIONAL DE TUBÉRCULOS Y RAÍCES ANDINAS EN
BASE A MARCADORES MORFOLÓGICOS Y MOLECULARES

Tesis de Posgrado para obtener el grado de
Maestría en “**Conservación y Manejo de
Recursos Fitogenéticos y Biotecnología
Vegetal Aplicada**”

Postulante: Fidel Hernan Cortez Alvarez
Tutor: Jorge Antonio Rojas Beltrán, Ph. D.

Cochabamba – Bolivia
2011

DEDICATORIA

*Para todas las familias más necesitadas,
quienes conservan y se nutren de los
valiosos recursos genéticos
de nuestra Madre Tierra.*

A toda mi Familia

AGRADECIMIENTOS

A todas las familias de productores ancestrales de papa, custodios milenarios de la biodiversidad en su conjunto; a nuestros ancestros por dejarnos este legado megadiverso y una cultura en armonía con la naturaleza. Todo es gracias a nuestro Creador.

A todas las personas e instituciones nacionales e internacionales que juntamente han trabajado para la caracterización, conservación y uso de la diversidad del germoplasma boliviano de papa. Al Estado Plurinacional de Bolivia, Instituto Nacional de Innovación Agropecuaria y Forestal (I.N.I.A.F.), por darme el honor de ver Nuestro Tesoro Vivo.

A los financiadores de las becas para la Maestría “Conservación y Manejo de Recursos Fitogenéticos y Biotecnología Vegetal Aplicada”: Comisión Universitaria para el Desarrollo (C.U.D.), Bélgica. Y a la Universidad Mayor de San Simón, Escuela Universitaria de Posgrado, Facultad de Ciencias Agrícolas Pecuarias Forestales y Veterinarias ” Martín Cárdenas” (FCAPFyV), Dirección de Posgrado.

A la Dirección de Posgrado, FCAPFyV, y todo su personal, por su guía, apoyo e incentivo.

Al financiamiento desde los Países Bajos mediante el IP – Holanda. A la Fundación PROINPA y todo su personal, por todo el apoyo y recursos ofrecidos en los últimos años.

A Jorge A. Rojas Beltrán, Ing. Agr. Ph.D., por su motivación, guía y apoyo constante. A Gabriela Bottani Claros Lic. M.Sc y Juan Herbas Ing. Agr. M.Sc., por sus sugerencias, consejos y apoyo permanente.

Yolita Sánchez... ¡muchas gracias por tu enseñanza!, y a todas mis queridas compañeras y compañeros del Laboratorio de Biología Molecular y Bioinformática, por su apoyo, consejos y buen ánimo.

A todos mis docentes, autoridades, compañeras y compañeros, que crean un ambiente de inspiración, que estimulan y encaminan nuestra formación.

A mi familia eterna, por su compañía continua, amor entrañable, e inspiración inacabable.

ÍNDICE DE CONTENIDO

| | |
|---|-------------|
| DEDICATORIA | i |
| AGRADECIMIENTOS | ii |
| ÍNDICE DE CONTENIDO | iii |
| ÍNDICE DE TABLAS | v |
| ÍNDICE DE FIGURAS | vi |
| ÍNDICE DE ANEXOS | vi |
| RESUMEN | vii |
| ABSTRACT | viii |
| 1. INTRODUCCIÓN | 1 |
| Objetivo general..... | 2 |
| Objetivos específicos | 2 |
| 2. REVISIÓN DE LITERATURA | 3 |
| 2.1. Importancia de la conservación de papa cultivada y la subespecie andígena..... | 3 |
| 2.1.1. Importancia del cultivo de <i>Solanum tuberosum</i> L. subsp. andígena Hawkes | 3 |
| 2.2. Taxonomía y genética de las especies de papa cultivada | 4 |
| 2.2.1. Ubicación taxonómica de la subespecie andígena | 5 |
| 2.2.2. Número cromosómico y filogenia de la papa cultivada | 6 |
| 2.3. Diversidad genética en la papa cultivada y la subespecie andígena | 7 |
| 2.4. Distribución geográfica de la subespecie andígena y la papa cultivada en Bolivia | 8 |
| 2.5. Colectas de la papa cultivada en Bolivia | 10 |
| 2.6. Caracterización morfológica en la subespecie andígena | 11 |
| 2.7. Evaluaciones agronómicas en la subespecie andígena | 12 |
| 2.8. Caracterización molecular en papa cultivada y la subespecie andígena..... | 12 |
| 2.9. Necesidad de construcción de colecciones núcleo | 13 |
| 2.10. Etapas en la construcción de colecciones representativas | 14 |
| 2.10.1. Identificación de los genotipos conservados | 14 |
| 2.10.2. Construcción de diferentes grupos significativos | 15 |
| 2.10.3. Decisión sobre el número de accesiones por grupo | 15 |
| 2.10.4. Selección de las accesiones que se incluirán en la colección núcleo..... | 16 |
| 2.11. Herramientas informáticas para conformar una colección núcleo..... | 17 |
| 2.11.1. Software para el análisis de datos de caracterizaciones..... | 17 |
| 2.11.2. Software para la selección de colecciones representativas de germoplasma.... | 17 |
| 3. MATERIALES Y MÉTODOS | 19 |
| 3.1. Localización..... | 19 |
| 3.2. Materiales y equipos | 19 |

| | |
|---|-----------|
| 3.2.1. Material vegetal | 19 |
| 3.2.2. Materiales y equipo de laboratorio | 19 |
| 3.2.3. Material de gabinete..... | 20 |
| 3.3. Métodos | 20 |
| 3.3.1. Caracterización morfológica y evaluaciones agronómicas..... | 20 |
| 3.3.2. Caracterización molecular | 21 |
| 3.3.2.1. Colecta del material vegetal..... | 21 |
| 3.3.2.2. Molido y almacenamiento de las muestras | 21 |
| 3.3.2.3. Extracción de ADN..... | 21 |
| 3.3.2.4. Cuantificación del ADN | 23 |
| 3.3.2.5. Amplificación y separación de fragmentos y matriz de datos | 23 |
| 3.3.3. Análisis de datos..... | 23 |
| 3.3.3.1. Cálculo del Índice de Polimorfismo (PIC) | 24 |
| 3.3.3.2. Cálculo del Índice de Heterocigosidad | 24 |
| 3.3.3.3. Análisis de estructura genética | 25 |
| 3.3.4. Construcción de la colección núcleo de la subespecie andígena | 25 |
| 3.3.4.1. Análisis de la información molecular | 25 |
| 3.3.4.2. Análisis con la información morfológica y evaluaciones agronómicas | 26 |
| 3.3.4.3. Elección de accesiones y formación de la colección núcleo | 26 |
| 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 28 |
| 4.1. Extracción de ADN..... | 28 |
| 4.2. Matriz binaria de datos moleculares | 28 |
| 4.3. Análisis de datos | 29 |
| 4.3.1. Distribución geográfica de las accesiones de la subespecie andígena..... | 29 |
| 4.3.2. Índices de diversidad y número de alelos encontrados..... | 30 |
| 4.3.3. Análisis de coordenadas principales | 31 |
| 4.4. Construcción de la colección núcleo de las accesiones de la subespecie andígena...33 | |
| 4.4.1. Análisis de información molecular y caracteres morfológicos..... | 33 |
| 4.4.2. Análisis de correlación con las evaluaciones agronómicas | 36 |
| 4.4.3. Formación de la colección núcleo de la subespecie andígena | 37 |
| 5. CONCLUSIONES | 47 |
| 6. RECOMENDACIONES | 48 |
| 7. BIBLIOGRAFÍA | 49 |
| ANEXOS..... | 55 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|---|----|
| Tabla 1. Propuestas de clasificación taxonómica de las especies cultivadas de papa | 5 |
| Tabla 2. Especies cultivadas de papa, número cromosómico y nivel de ploidía | 6 |
| Tabla 3. Reseña de colectas de papa en Bolivia | 11 |
| Tabla 4. Número de accesiones con caracterización morfológica por especie..... | 11 |
| Tabla 5. Resumen de alelos generados con 5 microsatélites en 6 especies de papa..... | 13 |
| Tabla 6. Ejemplo de datos binarios de 15 accesiones, microsatélite STG0016..... | 29 |
| Tabla 7. Índices calculados y alelos encontrados en los 20 microsatélites..... | 31 |
| Tabla 8. Caracteres de mayor significación en el espacio común de las accesiones | 35 |
| Tabla 9. Colección núcleo de 114 accesiones de la subespecie <i>andigena</i> | 39 |
| Tabla 10. Comparación entre la colección núcleo y la colección original | 42 |
| Tabla 11. Lista de accesiones con probable duplicidad..... | 45 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Altitud, temperatura y precipitación media anual de Bolivia | 8 |
| Figura 2. Distribución geográfica de <i>S. tuberosum</i> subsp. <i>andigena</i> y otras especies | 9 |
| Figura 3. Pobreza, diversidad y productividad en el cultivo de papa por ecoregiones..... | 10 |
| Figura 4. Ejemplo de visualización del ADN total de las accesiones | 28 |
| Figura 5. Distribución geográfica de 531 accesiones en el territorio boliviano | 30 |
| Figura 6. Agrupación de accesiones en análisis de coordenadas principales..... | 32 |
| Figura 7. Representación de las accesiones en el método de escalamiento..... | 34 |
| Figura 8. Tendencia de los caracteres más significativos en el espacio común | 35 |
| Figura 9. Tendencia de las evaluaciones agronómicas en el espacio común | 37 |
| Figura 10. Ventana que muestra el programa PowerCore al realizar la búsqueda mediante el método M de maximización de la diversidad retenida..... | 38 |
| Figura 11. Visualización de la colección núcleo generada de 114 cultivares | 40 |
| Figura 12. Colección generada al azar de 115 cultivares de la subespecie <i>andigena</i> | 41 |
| Figura 13. Distribución de la colección núcleo de la subespecie <i>andigena</i> | 43 |
| Figura 14. Distribución de las 114 accesiones de la colección núcleo | 44 |

ÍNDICE DE ANEXOS

| | |
|--|----|
| Anexo 1. Lista de iniciadores de los 20 microsatélites utilizados | 56 |
| Anexo 2. Dendograma de las 688 accesiones estudiadas..... | 57 |
| Anexo 3. Ejemplos de formas de utilizar una colección núcleo..... | 64 |

RESUMEN

La papa es el tercer cultivo alimenticio más importante en el mundo. En este cultivo, *Solanum tuberosum* L. subsp. *andigena* es la fuente principal de diversidad genética. Bolivia, como país centro de origen de la papa, conserva la colección de la subespecie *andigena* en el Banco Nacional de Tubérculos y Raíces Andinas, bajo custodia del Instituto Nacional de Innovación Agropecuaria y Forestal - INIAF.

Su conservación y manejo es difícil, debido a su complejidad genética y por ser tan numerosa. Por ello se ha propuesto construir una colección núcleo, a fin de que represente la diversidad genética de esta colección, y facilite su uso y conservación.

Se complementó la caracterización molecular de 688 accesiones de la subespecie *andigena*, utilizando 20 marcadores microsatélites. Se utilizó CTAB para la extracción de ADN nuclear. La separación de fragmentos se hizo mediante electroforesis capilar. Se realizó el escalamiento multidimensional con la información molecular. Se hizo la correlación de las dimensiones obtenidas, con la información morfológica, y la información de evaluaciones agronómicas. También se hizo el análisis de coordenadas principales. Se obtuvo una colección núcleo de 114 accesiones (un 16 % de la colección original), mediante la estrategia M o de maximización en la selección, utilizando el programa informático PowerCore. Así se retuvo un 100 % de la diversidad de alelos y la información morfológica. Se complementó el análisis con la información de evaluaciones agronómicas. La colección núcleo obtenida debe ser validada y enriquecida con mayor información de caracterizaciones y evaluaciones.

ABSTRACT

The potato is the third most nutritious important crop in the world. In this crop, *Solanum tuberosum* L. subsp. *andigena* is the main source of genetic diversity. Bolivia, as country center of origin of the potato, conserves the collection of the subspecies *andigena* in the National Bank of Andean Tubers and Roots, custodied by the INIAF (Instituto Nacional de Innovación Agropecuaria y Forestal).

Their conservation and handling is difficult, due to its genetic complexity and to be so numerous. Hence, it proposed to build a core collection, so that it represents the genetic diversity of this collection, and facilitate their use and conservation.

The molecular characterization of 688 accessions of the subspecies *andigena* was supplemented, using 20 microsatellites markers. CTAB was used for the extraction of nuclear DNA. The separation of fragments became by means of capillary electrophoresis. The multidimensional scaling was made with the molecular information. The correlation of the obtained dimensions was made, with the morphological information, and the information of agronomic evaluations. There was also made the principal coordinates analysis. A core collection of 114 accessions was obtained (16% of the original collection), by means of the M strategy (maximization in the selection), using the PowerCore software. It was retained this way 100% of the alleles diversity and morphological information. The analysis was supplemented with the information of agronomic evaluations. The obtained core collection should be validated, and enriched with information of characterizations and evaluations.

1. INTRODUCCIÓN

La papa cultivada es uno de los principales alimentos de origen andino, y sirve de sustento a las familias del mundo entero y de Bolivia. Actualmente ocupa el tercer lugar en el consumo mundial, como alimento básico en la dieta de la población (Centro Internacional de la Papa, 2008). Se constituye además en la principal fuente de ingresos para los agricultores de Bolivia, gran parte de los cuales produce este cultivo (Choque *et al.*, 2007).

Solanum tuberosum L. subsp. *andigena* posee la mayor diversidad genética de la papa cultivada. Por ello, la conservación de esta riqueza genética es una prioridad para el mejoramiento genético de la papa. Existen muchas accesiones poco utilizadas de la subespecie *andigena* que poseen la información genética para resistencia a heladas, sequía, plagas y enfermedades. Estas accesiones deben utilizarse en programas de mejoramiento.

Por otro lado, con el transcurso del tiempo, las variedades cultivadas van perdiendo su vigor, sanidad y la capacidad de responder a nuevas condiciones ambientales adversas. Esta situación reduce la productividad y el rendimiento del cultivo. Entonces, surge la necesidad de obtener nuevas variedades que hagan frente a los problemas anteriormente expuestos.

Se ha realizado la caracterización morfológica de las accesiones de esta subespecie conservadas *ex situ* en Bolivia, y paralelamente se ha realizado la caracterización molecular de las mismas. Los marcadores microsatélites son útiles para discriminar genotipos con mayor precisión y asignar una huella genética a cada accesión.

La gran diversidad hallada en las accesiones de la subespecie *andigena* genera dificultades en el manejo y conocimiento de su potencial genético. El manejo es mucho más difícil a causa del gran número de accesiones existentes. Esto ocasiona que no se utilice toda la riqueza potencial de esta subespecie.

Una colección núcleo, que represente la diversidad genética, facilitará el manejo, las evaluaciones y promoverá el uso eficiente de toda la diversidad conservada. Al tener accesiones representativas del germoplasma se reducirá la complejidad del manejo y el germoplasma será más accesible para realizar evaluaciones dentro la colección. Además, se

contribuirá a la utilización de los cultivares, ya sea de manera directa por los productores o para programas de mejoramiento (López y Oliveira, 2007).

Diferentes estrategias son utilizadas para conformar colecciones núcleo empleando marcadores morfológicos y moleculares. Por ello, es necesario desarrollar un método adecuado para construir una colección núcleo. Hasta el presente no se había realizado la formación de una colección núcleo de accesiones bolivianas de la subespecie *andigena*, utilizando las herramientas de la biología molecular.

En esa perspectiva, se plantea la construcción de una colección núcleo de *Solanum tuberosum* L. subsp. *andigena* empleando marcadores morfológicos y moleculares, complementándola con la información de evaluaciones agronómicas realizadas al germoplasma.

Objetivo general

Construir una colección núcleo de accesiones bolivianas de *Solanum tuberosum* L. subsp. *andigena* Hawkes en base a marcadores morfológicos y moleculares.

Objetivos específicos

-Complementar y recolectar información de caracterización molecular, caracterización morfológica y evaluaciones agronómicas de accesiones de *Solanum tuberosum* L. subsp. *andigena*.

-Conformar una colección núcleo de *Solanum tuberosum* L. subsp. *andigena* a partir de 688 accesiones en base a la información molecular, morfológica y mediante evaluaciones agronómicas.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Importancia de la conservación de papa cultivada y la subespecie *andigena*

El centro mundial de origen y diversidad de la papa se encuentra en Bolivia. La papa se cultiva por milenios desde altitudes próximas al nivel del mar como ser en los yungas bolivianos, hasta altitudes superiores a los 4200 metros, como es el altiplano. La multivariabilidad existente en la papa es producto de su domesticación, habiéndose obtenido cultivares de diferentes usos, colores, formas, sabores, características de calidad, precocidad, respuestas a factores bióticos y abióticos, entre otros (Rea, 1991).

La papa es el cultivo más productivo, al compararla con todos los demás cultivos alimenticios más importantes. Una hectárea de papa puede rendir entre dos y cuatro veces más cantidad de alimento que los cultivos de granos. La papa produce más alimento por unidad de agua que cualquier otro cultivo importante, y con relación a los cereales, es hasta siete veces más eficiente (Centro Internacional de la Papa, 2010; FAO, 2008).

La papa es el tubérculo alimenticio más importante del mundo. Aporta la mayor cantidad de carbohidratos en la dieta de cientos de millones de personas en los países en desarrollo, incluyendo poblaciones de Sud América y Asia. Es el tercer cultivo alimenticio de importancia mundial en el consumo humano, después del arroz y el trigo (Centro Internacional de la Papa, 2008).

2.1.1. Importancia del cultivo de *Solanum tuberosum* L. subsp. *andigena* Hawkes

Solanum tuberosum L. subsp. *andigena* Hawkes constituye el grupo más importante y representativo dentro de las especies de papa cultivada en los Andes (Bonierbale *et al.*, 2004). Lo mismo se refleja en las colecciones *ex situ*, donde este grupo viene a ser el más numeroso dentro del germoplasma conservado en el Banco Nacional de Germoplasma de Tubérculos y Raíces Andinas de Bolivia, y de igual manera en la colección conservada en el Centro Internacional de la Papa (Durán *et al.*, 2003; Mayer, 2001).

Actualmente la amplia diversidad de este cultivo se ha visto amenazada, principalmente por el uso de variedades comerciales. Por ejemplo, unas cuantas variedades son usadas para la producción y gradualmente otros tipos se dejan de sembrar y se pierden. Algunas variedades antiguas ya no se pueden encontrar, también debido a trastornos sociales, enfermedades o cambios climáticos (Centro Internacional de la Papa, 2008).

2.2. Taxonomía y genética de las especies de papa cultivada

Es complejo clasificar las papas cultivadas y definir el número de especies, así como sus interrelaciones. Se tienen diferentes propuestas para clasificarlas, pero se han presentado diferencias entre cada una de ellas. Por lo tanto existe necesidad de lograr un consenso para lograr una propuesta definitiva, coherente y práctica (Rodríguez, 2009).

Por ejemplo, según Hawkes (1990) las papas cultivadas de la región andina se han agrupado en 8 especies y subespecies del género *Solanum*: *S. stenotomum*, *S. goniocalyx*, *S. phureja*, *S. ajanhuiri*, *S. curtilobum*, *S. juzepczukii*, *S. tuberosum* subsp. *andigena* y *S. tuberosum* subsp. *tuberosum*. Alternativamente, han sido considerados como grupos dentro de una sola especie: *S. tuberosum*, en base al análisis de la caracterización morfológica de 267 accesiones en el Centro Internacional de la Papa (Huamán y Spooner, 2002).

Spooner *et al.* (2007) proponen clasificar las papas cultivadas en cuatro especies complementando información morfológica y molecular. Las cuatro especies son: *S. ajanhuiri*, *S. juzepczukii*, *S. curtilobum* y *S. tuberosum*. Dentro de este último se incluye a dos grupos: el grupo Andigena y el grupo Chilotanum (que corresponde a la subespecie *tuberosum*). Debido a su complejidad, los autores mencionados señalan que para clasificarlas debe contarse con un conjunto integral de herramientas de caracterización y evaluación de las accesiones.

Un resumen de las propuestas de clasificación se muestra en la Tabla 1, ubicándose a la subespecie *andigena*, en la especie *S. tuberosum*.

Tabla 1. Propuestas de clasificación taxonómica de las especies cultivadas de papa

| Ploidía | Dodds (1962) | Bukasov (1971), Lechnovich (1971) | Hawkes (1990) | Ochoa (1990, 1999) | Huamán y Spooner (2002) | Spooner et al. (2007) |
|---------|---|---|---|--|---|---|
| 2x | <i>S. tuberosum</i> Grupo Stenotomum Subgrupo Goniocalyx Subgrupo Stenotomum Grupo Phureja Subgrupo Amarilla Subgrupo Phureja | <i>S. ajanhuiri</i> Juz. y Bukasov <i>S. canarense</i> Juz. y Bukasov <i>S. erlansonii</i> Bukasov <i>S. goniocalyx</i> Juz. y Bukasov <i>S. macmillanii</i> Bukasov <i>S. phureja</i> Juz. y Bukasov <i>S. rybinii</i> Juz. y Bukasov <i>S. stenotomum</i> Juz. y Bukasov | <i>S. ajanhuiri</i> <i>S. stenotomum</i> ssp. <i>goniocalyx</i> ssp. <i>Stenotomum</i> <i>S. phureja</i> ssp. <i>hygrothermicum</i> ssp. <i>phureja</i> | <i>S. ajanhuiri</i> <i>S. stenotomum</i> <i>S. goniocalyx</i> <i>S. phureja</i> | <i>S. tuberosum</i> Grupo Ajanhuiri Grupo Stenotomum Grupo Phureja | <i>S. ajanhuiri</i> |
| 3x | <i>S. tuberosum</i> Grupo Chaucha <i>S. juzepczukii</i> | <i>S. boyacense</i> Juz. y Bukasov <i>S. chaucha</i> Juz. y Bukasov <i>S. choclo</i> Bukasov <i>S. ciezae</i> Bukasov y Lechn. <i>S. cuencanum</i> Juz. y Bukasov <i>S. juzepczukii</i> Bukasov <i>S. mamilliferum</i> Juz. y Bukasov <i>S. tenuifilamentum</i> Juz. y Bukasov | <i>S. chaucha</i> <i>S. juzepczukii</i> | <i>S. chaucha</i> <i>S. juzepczukii</i> | Grupo Chaucha Grupo Juzepczukii | <i>S. juzepczukii</i> |
| 4x | <i>S. tuberosum</i> Grupo Andigena Grupo Tuberosum | <i>S. andigenum</i> Juz. y Bukasov <i>S. molinae</i> Juz. <i>S. leptostigma</i> Juz. <i>S. tuberosum</i> L. | <i>S. tuberosum</i> ssp. <i>andigena</i> ssp. <i>tuberosum</i> | <i>S. tuberosum</i> ssp. <i>andigena</i> ssp. <i>Tuberosum</i> <i>S. hygrothermicum</i> | Grupo Andigena Grupo Chilotanum | <i>S. tuberosum</i> Grupo Andigena Grupo Chilotanum |
| 5x | <i>S. curtilobum</i> | <i>S. curtilobum</i> Juz. y Bukasov | <i>S. curtilobum</i> | <i>S. curtilobum</i> | Grupo Curtilobum | <i>S. curtilobum</i> |

Fuente: Rodríguez (2009).

2.2.1. Ubicación taxonómica de la subespecie *andigena*

La subespecie *andigena* de papa cultivada ha sido clasificada de la siguiente manera, según Estrada (2001) y Huamán (1986):

Reino: *Plantae*

División: *Magnoliophyta*

Clase: *Magnoliopsida*

Orden: *Solanales*

Familia: *Solanaceae* Juss., nom. cons.

Género: *Solanum* Linnaeus

Sección: *Petota* Dumortier

Subsección: *Potatoe* G. Don

Superserie: *Rotacea* Hawkes

Serie: *Tuberosa* Rybd., Hawkes

Especie: *Solanum tuberosum* L.

Subespecie: *Solanum tuberosum* L. subsp. *andigena* Hawkes

Nombre común: papa

Sinónimo según USDA-GRIN (2011):

Solanum tuberosum L. subsp. *andigenum* (Juz. & Bukasov) Hawkes

Spooner *et al.* (2007) proponen que el taxón de subespecie *andigena*, no se considere como una subespecie, sino que sea incluido como un grupo dentro de la especie *S. tuberosum*. La denominación propuesta es Grupo Andigenum, por la complejidad genética observada.

2.2.2. Número cromosómico y filogenia de la papa cultivada

Según Rodríguez (2009) y Huamán (1986) todas las especies cultivadas pertenecen a la Sección Petota, y según el nivel de ploidía varían entre el nivel diploide y pentaploide (Tabla 2).

Tabla 2. Especies cultivadas de papa, número cromosómico y nivel de ploidía.

| Especies | Número de cromosomas | Nivel de ploidía |
|--|----------------------|------------------|
| <i>S. x ajanhuiri</i> <i>S. goniocalyx</i> <i>S. phureja</i> <i>S. stenotomum</i> | $2n = 2x = 24$ | diploide |
| <i>S. x chaucha</i> <i>S. x juzepczukii</i> | $2n = 3x = 36$ | triploide |
| <i>S. tuberosum</i> subsp. <i>tuberosum</i> subsp. <i>andigena</i> | $2n = 4x = 48$ | tetraploide |
| <i>S. x curtilobum</i> | $2n = 5x = 60$ | pentaploide |

Fuente: Huamán (1986)

Sin embargo, Spooner *et al.* (2007) ponen en evidencia que la determinación de la ploidía no es suficiente para explicar la estructura genética de la papa cultivada, especialmente en el caso de la subespecie *andigena*. Señalan que varias accesiones diploides, triploides y tetraploides se agrupan en el conjunto de accesiones que estudiaron, a los que nombraron Grupo Andigenum. También observaron varios casos de ploidía diferente en esta subespecie que fueron agrupadas con las accesiones de las otras especies de papa cultivada.

Respecto a su origen filogenético, Estrada (2001) señala que varias especies silvestres pudieron ser los ancestros de la papa cultivada. Por ejemplo, la subespecie *andigena* se habría originado del cruce entre *S. stenotomum* y *S. sparsipilum* (Hawkes, 1988), o de *S. stenotomum* y *S. phureja* (Hawkes, 1979).

2.3. Diversidad genética en la papa cultivada y la subespecie *andigena*

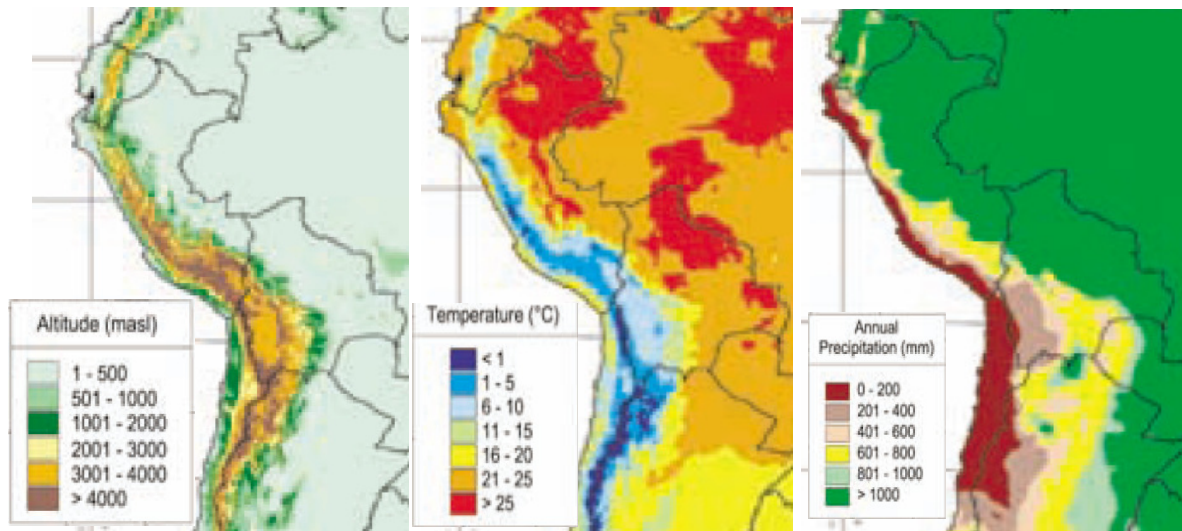
Existe una amplia y valiosa riqueza genética de papas cultivadas (*Solanum* spp.), en los agroecosistemas de montaña de los Andes bolivianos, caracterizadas por su diversidad y alta tolerancia a condiciones ambientales adversas (Terrazas *et al.*, 2005). La papa, en los Andes, posee los mayores recursos genéticos que se conoce entre los cultivos para los diferentes caracteres y factores adversos. Además, su capacidad de cruzamiento, entre diferentes especies del género para el mejoramiento, hace su cultivo aún más valioso (Estrada, 2001).

Existe una amplia variabilidad morfológica y fisiológica en *Solanum tuberosum* L. subsp. *andigena* Hawkes (Sukhotu *et al.*, 2005). Cientos de cultivares fueron descritos morfológicamente en Bolivia, entre ellos están: Imilla Blanca, Imilla Negra, Lunka Imilla, Q'oyllu, Sani Imilla, Sani Runa, Saq'ampaya, Waych'a, Wila Imilla, Wila Waka Lajra, entre otros. Cada uno de ellos posee variadas formas, colores, sabores y diferentes usos (Ugarte e Irirarte, 2003).

Esta diversidad en la subespecie *andigena* ha sido un material genético importante para realizar los trabajos de caracterización, evaluación y mejoramiento. Inicialmente las accesiones fueron caracterizadas principalmente por la forma, color y otras características del tubérculo, por la alta diversidad observada (Alandia, 1994). También para el mejoramiento genético se utilizaron principalmente accesiones de la subespecie *andigena* utilizando esa importante diversidad genética (Estrada *et al.*, 1995).

2.4. Distribución geográfica de la subespecie *andigena* y la papa cultivada en Bolivia

El territorio boliviano posee una amplia diversidad geográfica, en comparación con el resto de los países. Existen las condiciones en altitud sobre el nivel del mar, temperatura y precipitación que dieron origen a la diversidad de la papa. Esto se puede ver de manera general en los mapas presentados por Hijmans *et al.* (2002) (Figura 1).

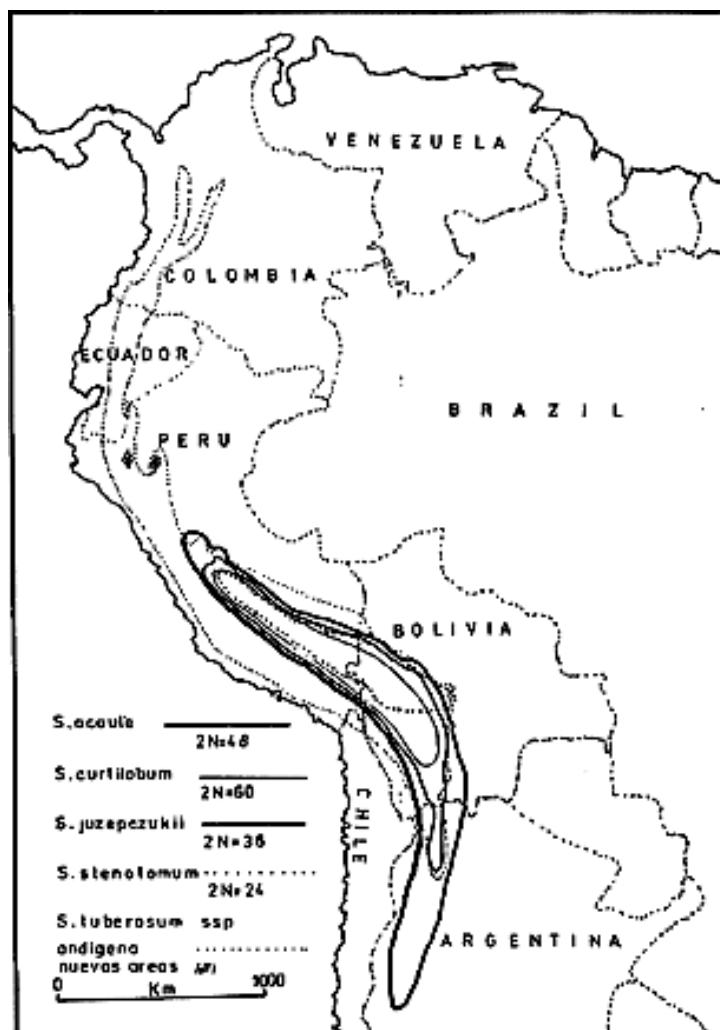


(Fuente: Hijmans *et al.* 2002).

Figura 1. Altitud, temperatura y precipitación media anual de Bolivia.

La representación geográfica de la diversidad de la papa cultivada en la colección boliviana de germoplasma es notable, y señala la alta diversidad encontrada en el territorio boliviano. El germoplasma conservado proviene de siete, de los nueve departamentos de Bolivia y representa a 52 provincias, según la información de la subespecie *andigena* conservada en el Banco Nacional de Tubérculos y Raíces de Bolivia (2009).

En la Figura 2 se muestra una proyección sobre la distribución de papa cultivada, junto a *Solanum tuberosum* subsp. *andigena* (Schmiediche, 1977). Se puede notar que todas las especies coinciden en su mayor amplitud de distribución en el territorio boliviano. También se observa que *S. tuberosum* subsp. *andigena* se expande hacia el norte y sur del país, en una estrecha franja geográfica.



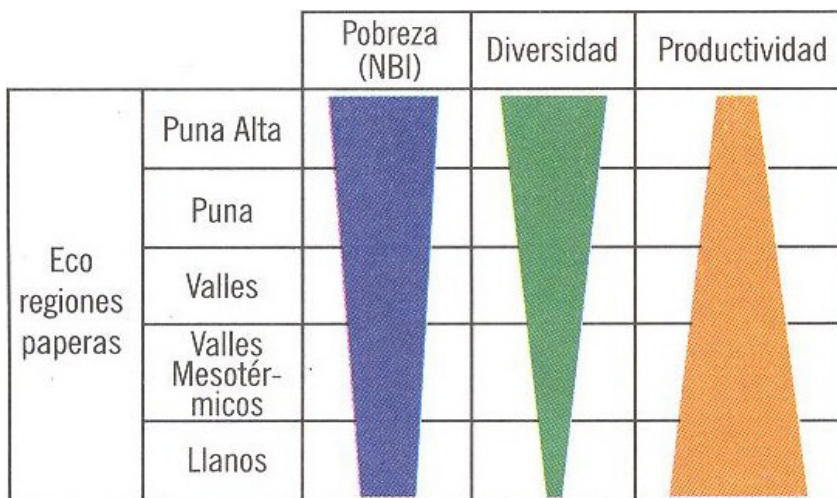
Fuente: Schmediche (1977).

Figura 2. Distribución geográfica de *Solanum tuberosum* subsp. *andigena* y otras especies

Por otra parte, a pesar de la amplia diversidad de papa observada en las diferentes ecoregiones bolivianas, se observa una realidad socioeconómica que es imprescindible resaltar. Por ejemplo, las zonas de mayor pobreza y de necesidades insatisfechas de Bolivia coinciden con las mismas zonas de mayor diversidad de la papa cultivada. Estas mismas zonas son las de mayor riesgo climático (Plan Nacional de Desarrollo de Bolivia, 2009).

Existe una relación entre diversidad, pobreza y productividad en el cultivo de papa para las diferentes ecoregiones, que debe encararse en su conservación y mejoramiento (Figura 3). Esta situación incide fuertemente en la vida de los agroecosistemas, con la tendencia a

seguir reduciéndose la diversidad genética (Balderrama y Terceros, 2008). Aunque el análisis en la Figura 3 se presenta de manera general, estimula a profundizar el conocimiento de la elevada diversidad de variedades nativas en Bolivia.



Fuente: Balderrama y Terceros (2008)

Figura 3. Pobreza, diversidad y productividad en el cultivo de papa por ecoregiones.

Por ello, se debe profundizar en las estrategias de conservación y manejo de esta diversidad. Por ejemplo, considerando el éxito de los agricultores andinos al proteger esta diversidad. Cada cultivar es diferente en su respuesta a los diferentes factores adversos, y su uso por el agricultor es también diverso (Rea, 1994).

2.5. Colectas de la papa cultivada en Bolivia

Las colectas de papa se han realizado a fin de encontrar material genético valioso principalmente para incorporarlo a programas de mejoramiento. Las primeras colectas con fines de investigación convencional en Bolivia se reporta desde el año 1910 en adelante (Alandia, 1994). Sin embargo a través del tiempo, se estima que no más del cuatro por ciento de la riqueza genética ha sido utilizada en programas de mejoramiento (Contreras, 2005). En la Tabla 3 se presenta una reseña de colectas realizadas en Bolivia.

Tabla 3. Reseña de colectas de papa en Bolivia.

| Año | Investigadores | Origen de la investigación |
|-------------|--|----------------------------|
| 1910 | Walter Cevallos Tovar | Bolivia |
| 1926 a 1932 | Juzepczuck, Lekhnovitch, Vavilov, Bukasov, Kesselbrenner | URSS |
| 1930 | E. Baur, Schick von Rosenstiel | Alemania, (MPI) |
| 1931 | Erlanson, Mac Millan | Estados Unidos |
| 1933 a 1934 | C. Hammarlund | Suecia |
| 1939 | Martín Cárdenas | Bolivia |
| 1938 a 1939 | Balls, Hawkes, Gourlay | Comunidad de Naciones |
| 1940 | Humberto Gandarillas | Bolivia |
| 1958 | Zhukovsky | URSS |
| 1958 | Correl | Estados Unidos |
| 1958 | Ross, Rimpau, Dieris | Alemania |
| 1959 | Ross | Alemania |
| 1960 | Dodds, Pasman and Hjerting | Inglaterra |
| 1962 | Dodds y Simonds | Inglaterra |
| 1971 | Hawkes, Herting y Cribb | Inglaterra |

Fuente: Alandia (1994) y Contreras (2005).

2.6. Caracterización morfológica en la subespecie *andigena*

Un 79 % de la colección conservada de papa cultivada boliviana tiene caracterización morfológica, y en la misma proporción en el caso del grupo *andigena*. La colección completa cuenta con datos de caracterización de follaje en un 96 por ciento, datos de floración un 91 por ciento, datos de fruto un 79 por ciento y datos de tubérculo un 97 por ciento (Zeballos *et al.*, 2009). La Tabla 5 muestra el número de accesiones caracterizadas.

Tabla 4. Número de accesiones con caracterización morfológica por especie

| Especie | Nº de accesiones |
|---|------------------|
| <i>S. tuberosum</i> subsp. <i>andigena</i> | 815 |
| <i>S. ajanhuiri</i> | 49 |
| <i>S. tuberosum</i> subsp. <i>tuberosum</i> | 48 |
| <i>S. x curtilobum</i> | 79 |
| <i>S. goniocalyx</i> | 4 |
| <i>S. x juzepczukii</i> | 77 |
| <i>S. phureja</i> | 1 |
| <i>S. stenotomum</i> | 205 |
| <i>Solanum</i> sp. | 4 |
| Total | 1282 |

Fuente: Zeballos *et al.* (2009).

2.7. Evaluaciones agronómicas en la subespecie *andigena*

Según Contreras (2005) las evaluaciones realizadas en el mundo, en las colecciones de papas indican que son importantes por el potencial aporte de genes. Estas evaluaciones son útiles para conocer la respuesta a diferentes factores como ser: hongos, bacterias, virus, insectos, nematodos, heladas, calor, sequía, salinidad. Otras evaluaciones permiten conocer el alto contenido de sólidos, alto contenido de fenoles, buena calidad culinaria, entre otros.

Se ha realizado diferentes evaluaciones agronómicas a la colección de papa boliviana. Un 67 por ciento de las accesiones del grupo *andigena* han sido evaluadas por su respuesta a factores bióticos, y un 19 por ciento de las especies de papa conservadas *ex situ* (FAO, 2005).

Existen evaluaciones que son difíciles de planificar, como por ejemplo, la respuesta a heladas. Este fenómeno natural no siempre se presenta en un determinado sitio y periodo del año, o puede presentarse con una severidad que destruya las plantas. El año 2009 se registró una helada que afectó a toda la colección en campo, por lo que se realizó una evaluación preliminar para este factor abiótico. (Zeballos *et al.*, 2009).

2.8. Caracterización molecular en papa cultivada y la subespecie *andigena*

Se ha iniciado la caracterización del germoplasma de papa cultivada boliviana utilizando marcadores moleculares. Se han utilizado microsatélites para evaluar la diversidad de la colección, revelando una alta diversidad principalmente en la subespecie *andigena*.

Por ejemplo, se ha establecido patrones moleculares de referencia para 5 microsatélites: STWAX-2, STPoAC-58, STM 0037, STM 1104 y STM 0019. Sin embargo se recomienda comparar dicho patrón, con el establecido en el Centro Internacional de la Papa, y continuar con los estudios de diversidad genética a fin de asignar una huella genética a todas las accesiones de la colección (Rojas *et al.*, 2009).

En la Tabla 6 se muestra un resumen de los alelos generados para los 5 microsatélites, según Rojas *et al.* (2009).

Tabla 5. Resumen de alelos generados con 5 microsatélites en 6 especies de papa

| MICROSATÉLITES : | STWAX-2 | STPoAc58 | STM0037 | STM1104 | STM0019 |
|--|----------|----------|-----------|-----------|-----------|
| Rango de alelos (pb) : | 216-239 | 241-252 | 74-126 | 163-186 | 91-236 |
| <i>S. tuberosum</i> subsp. <i>andigena</i> | 5 | 6 | 13 | 8 | 16 |
| <i>S. ajanhuiri</i> | 4 | 4 | 7 | 7 | 10 |
| <i>S. x curtilobum</i> | 3 | 1 | 2 | 3 | 4 |
| <i>S. x juzepczukii</i> | 5 | 4 | 7 | 5 | 7 |
| <i>S. phureja</i> | 3 | 3 | 3 | 5 | 4 |
| <i>S. stenotomum</i> | 5 | 6 | 10 | 10 | 13 |
| Total de alelos por microsatélite : | 6 | 7 | 13 | 14 | 24 |

Fuente: Rojas *et al.* (2009).

2.9. Necesidad de construcción de colecciones núcleo

Al incrementarse el número de accesiones en las colecciones, el tamaño de estas se convierte en un factor limitante para mejorar el conocimiento y el uso de las mismas. Frente a esta situación surge la necesidad de construir colecciones representativas llamadas también colecciones núcleo. Se define la colección núcleo como una muestra representativa de la colección en la cual se incluye la variabilidad genética de un cultivo y las especies emparentadas con un mínimo de repeticiones (Frankel y Brown, 1984).

Los marcadores morfológicos y moleculares son complementarios para la selección de la colección núcleo con el fin de asegurar su representatividad. Los marcadores moleculares son una herramienta sensible y precisa para complementarse con los marcadores morfológicos. Adicionalmente, se debe complementar la selección de la colección representativa con las evaluaciones realizadas e información ecogeográfica para determinar los usos y el manejo del germoplasma (Hidalgo, 2003; van Hintum *et al.*, 2003).

En Bolivia se construyó una colección núcleo de papa en el Banco Nacional de Germoplasma de Tubérculos y Raíces Andinas, que actualmente es administrada por el Instituto Nacional de Innovación Agropecuaria y Forestal –I.N.I.A.F., basándose en la caracterización morfológica. La determinación del número de accesiones dentro de cada

grupo, y la selección de estas fue realizada mediante el método de componentes principales para variables cualitativas, sin embargo en el caso de la subespecie *andigena* se consideró que su diversidad no fue totalmente representada debido a las limitaciones del método utilizado y por tratarse únicamente de caracteres morfológicos, considerando la alta variabilidad que encierra la colección boliviana (Durán *et al.*, 2003).

2.10. Etapas en la construcción de colecciones representativas

Los criterios y estrategias para la formación de una colección núcleo resultan del análisis de la información que contiene cada accesión (van Hintum *et al.*, 2003). López y Oliveira (2007) compararon varios métodos para construir colecciones núcleo basándose en la caracterización morfológica. Estudiaron muestreos estratificados y aleatorios, comprobándose la efectividad de los métodos multivariados frente a los métodos aleatorios en la construcción de colecciones núcleo.

Más adelante, para definir el tamaño de la colección núcleo, se tomará en cuenta diferentes factores. Estos factores incluyen: el grado de diversidad genética de la colección, los recursos disponibles, y las condiciones de manejo existentes, entre otros. Por ejemplo, si hay muchos grupos pequeños en la colección se tomaría un mayor número de accesiones. También la complejidad del manejo sería otro factor que incidiría en el tamaño de la colección núcleo (van Hintum *et al.*, 2003).

A continuación se resume las etapas en el desarrollo de una colección representativa, existiendo diferentes opciones y herramientas estadísticas para elegirla a partir de una misma colección base.

2.10.1. Identificación de los genotipos conservados

En esta etapa, se debe elegir a todo el material que estaría representado en la futura colección núcleo. Con frecuencia se busca representar a todo el material de cierta especie cultivada, en determinados casos se han conformado colecciones que representan sólo una

parte de una colección inicial, o en otros casos se incluye además a sus parientes silvestres (van Hintum *et al*, 2003).

2.10.2. Construcción de diferentes grupos significativos

La representatividad de la colección núcleo será eficaz, si se separan primero grupos con alguna significación. Los grupos deben conformarse de manera que se maximice la variación entre grupos y se reduzca al mínimo la variación dentro de ellos. Sin embargo, todo ello depende de la forma en que varía la diversidad genética y la información disponible sobre las accesiones (van Hintum *et al*, 2003).

Esta estratificación puede concluir cuando no es posible dividir en más grupos. Por ejemplo, esto sucedería cuando los grupos son genéticamente homogéneos o porque no se cuenta con información adicional confiable que permita separar grupos genéticamente diferentes. El análisis multivariado podría ayudar significativamente a este procedimiento (van Hintum *et al*, 2003).

2.10.3. Decisión sobre el número de accesiones por grupo

Consiste en la elección del número de accesiones que se incluirá en cada grupo, luego de la división en grupos diferenciados genéticamente. Se pueden asignar accesiones según el número que contenga cada grupo, la diversidad dentro de cada grupo, y las necesidades de los usuarios. Combinar diferentes estrategias sería lo más apropiado. Otra decisión común es incluir al menos una accesión de cada grupo aunque se trate de grupos muy pequeños (van Hintum *et al*, 2003).

Existen procedimientos que se basan ya sea en el tamaño del grupo o en la diversidad encontrada. Cuando se elige utilizar el tamaño de los grupos, el número de cada grupo reflejará el resultado de las colectas, del trabajo de investigación, de las necesidades históricas y del interés de los usuarios. Cuando se elige utilizar la diversidad de marcadores, se tienen datos que indican cuánta diversidad hay dentro de los grupos. Sin embargo, el conocimiento que se tenga de las accesiones, que puede ser subjetivo como el

conocimiento informal, ayudará a realizar ajustes al tamaño de cada grupo (van Hintum *et al*, 2003).

Existe un método llamado estrategia M que se ha utilizado en el desarrollo de una colección núcleo en base a datos de marcadores moleculares. Éste método utiliza la información de las accesiones, analizando los diferentes tipos de alelos presentes. Mediante un programa lineal se maximiza el número de alelos retenidos en el número de accesiones. Este método ayuda a identificar las accesiones que se deberían incluir en el grupo (van Hintum *et al*, 2003).

2.10.4. Selección de las accesiones que se incluirán en la colección núcleo

El paso final consiste en elegir las accesiones que realmente conformarán la colección núcleo, puesto que hasta aquí solo se tiene una colección clasificada por estratos o grupos. Entonces, faltará definir cuáles de las accesiones se van a escoger de cada grupo, siendo las que mejor representen al grupo y cumplan mejor la función y los objetivos de la colección núcleo (van Hintum *et al*, 2003).

Hay diferentes criterios y procedimientos para la selección tanto analíticos como una elección al azar. Cuando se tiene información documentada de las accesiones, tales como cultivares bien conocidos, la selección será diferente del caso de especies silvestres desconocidas. Así, también influirán no solo la diversidad genética, sino también si hay accesiones importantes utilizadas en programas de mejoramiento, asimismo la calidad de la información de las accesiones. (van Hintum *et al*, 2003).

En la decisión del tamaño de la colección núcleo, no existe un parámetro fijo. Las características genéticas de la población tendrán su efecto en el tamaño de la colección núcleo, así como aspectos de manejo o los recursos disponibles. Todo ello fue señalado por van Hintum *et al* (2003), que citando a diversos trabajos para formar colecciones núcleo, indican que generalmente se llega a conformar entre un 5 a 20 % del tamaño de la colección original, pero el rango observado en diferentes colecciones en el mundo es desde menos de 1% hasta más del 50%.

2.11. Herramientas informáticas para conformar una colección núcleo

Existen programas informáticos con diferente capacidad y utilidades que sirven de herramientas para evaluar la diversidad genética (van Hintum *et al*, 2003). En dichos programas se puede realizar el análisis con grandes cantidades de datos, utilizando las diferentes técnicas de análisis multivariado (Valadez y Kahl, 2000). Adicionalmente, se considera que la información geográfica tiene importancia en la determinación de colecciones núcleo (van Hintum *et al*, 2003), para lo cual también existen programas especializados. Algunos de los programas utilizados son citados a continuación.

2.11.1. Software para el análisis de datos de caracterizaciones

NTSYSpc (Rohlf, 2008) es un programa informático que permite realizar distinto tipo de cálculos: para observación, manejo de matrices, cálculo de coeficientes y obtención de matrices de similitud, obtención de dendogramas. También para realizar métodos de ordenación: como el análisis de coordenadas principales y otros, así como obtener gráficos correspondientes de alta calidad.

DARwin (Perrier y Jacquemoud-Collet, 2006) es un programa de uso libre desarrollado para el análisis de diversidad con diferentes funciones. Se puede transformar matrices, realizar análisis multivariado, construcción de dendogramas, y visualizarlos en gráficos editables. Los análisis que permite realizar para describir la estructura de diversidad en una población se basa en los métodos de distancia genética (Perrier *et al.*, 2003).

2.11.2. Software para la selección de colecciones representativas de germoplasma

Se ha desarrollado algunas herramientas informáticas para maximizar la diversidad representada en una colección. El programa MSTRAT ayuda al usuario a definir el tamaño de la colección básica para conformar la colección representativa, y también para estudiar y maximizar la riqueza genética en la futura colección representativa (Gouesnard *et al.*, 2001).

Otro programa desarrollado llamado PowerCore, propone un análisis similar para maximizar la representatividad de la futura colección núcleo. Además se ha realizado una comparación de métodos y herramientas utilizadas de los programas MSTRAT y PowerCore. La comparación fue realizada con información proveniente de una colección de arroz para dos grupos de datos: fenotípicos y microsatélites (Kyu –Won *et al.*, 2007).

En la comparación mencionada se afirma que PowerCore permitió optimizar en un 100 % la representatividad tanto para datos fenotípicos como moleculares. En tanto que MSTRAT mostró una cobertura de un 94,8 % para datos fenotípicos y un 88,9% para datos provenientes de microsatélites (Kyu –Won *et al.*, 2007).

Otra herramienta muy útil en el análisis multivariado de datos es el programa PASW Statistics V. 18. Posee importantes herramientas para análisis de datos. Por ejemplo, mediante las funciones de PROXSCAL, se procede a realizar el escalamiento de proximidades, lo que le permite analizar las similitudes entre objetos e incorporar características para los objetos en el mismo análisis. Con esta herramienta se muestra las proximidades como distancias en un orden de asignación para obtener una comprensión espacial de cómo se relacionan los objetos estudiados (PASW, 2009).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Localización

Este estudio se realizó en el Laboratorio de Biología Molecular y Bioinformática, en la Fundación PROINPA (Fundación para la Promoción e Investigación de Productos Andinos), localidad de El Paso, Provincia Quillacollo, Bolivia.

3.2. Materiales y equipos

3.2.1. Material vegetal

El trabajo comprende el análisis de 688 muestras de accesiones provenientes del Banco Nacional de Germoplasma de Tubérculos y Raíces Andinas, que está bajo responsabilidad del Estado Plurinacional de Bolivia mediante el Instituto Nacional de Innovación Agropecuaria y Forestal – I.N.I.A.F. Las accesiones fueron colectadas para su conservación *ex situ* en diferentes años, de zonas de producción tradicional de papa de 7 departamentos de Bolivia: La Paz, Oruro, Potosí, Cochabamba, Santa Cruz, Chuquisaca y Tarija.

Se colectaron para el estudio folíolos de hojas en crecimiento, en buen estado fisiológico y de sanidad de 688 accesiones de papa correspondientes a la subespecie *andigena*. Esta colecta fue hecha para complementar la caracterización molecular de las accesiones. Las 688 accesiones representan a una parte de la colección de la subespecie *andigena*, debido a la disponibilidad del material vegetal y el tiempo requerido para el trabajo de laboratorio.

3.2.2. Materiales y equipo de laboratorio

Para realizar la colecta de los folíolos se utilizaron: cajas de plastofomo para conservar las muestras, bolsas, hielo, tijeras y etiquetas.

Los equipos utilizados fueron: refrigerador, congeladora (-20 °C), campana extractora de gases, micropipetas de diferentes capacidades, microcentrífuga de 12000 rpm, baño María, equipo de electroforesis, medidor de pH, balanzas electrónica y analítica, estabilizador de

voltaje, horno microondas, transiluminador de rayos ultravioleta, digitalizador de imágenes para la visualización del ADN.

Se utilizaron los siguientes reactivos: CTAB Bromuro de hexadeciltrimetilamonio (Cetyltrimethyl ammonium bromide ó CTAB en inglés), tampón de extracción CTAB 2X, β -mercaptoetanol, cloroformo, isopropanol, etanol absoluto diluido a 75%, ARNasa. Además: agarosa, TBE 10X, Tris HCl 1M pH 8.0, ácido bórico y EDTA 0.5 M pH 8.0, marcador de peso molecular de 10000 pares de bases, tampón de cargado, SYBR green, dNTPs, magnesio, Taq polimerasa, tampón, iniciadores para microsatélites de papa o SSR (abreviación de “Simple Sequence Repeat”, nombre que indica que los microsatélites son secuencias simples repetidas de nucleótidos de la molécula de ADN)

3.2.3. Material de gabinete

Información de caracterizaciones morfológicas y evaluaciones agronómicas de 688 accesiones de la subespecie *andigena*, realizadas en años anteriores. Equipo y programas informáticos. Software para la selección de colecciones representativas de germoplasma. Software para análisis de datos moleculares. Software para análisis geoespacial de datos. Información sobre el origen geográfico de las accesiones.

3.3. Métodos

3.3.1. Caracterización morfológica y evaluaciones agronómicas

Se accedió a la base de datos de la caracterización morfológica y evaluaciones agronómicas de las accesiones de la subespecie *andigena*, del Banco Nacional de Germoplasma de Tubérculos y Raíces de Bolivia, que está bajo la administración del I.N.I.A.F. Las caracterizaciones y evaluaciones fueron realizadas en diferentes años, anteriores a la realización del presente trabajo.

3.3.2. Caracterización molecular

3.3.2.1. Colecta del material vegetal

Se seleccionaron folíolos de hojas en pleno crecimiento, en condiciones apropiadas de sanidad, almacenándolas en bolsas de polietileno a - 20 °C, hasta el momento de molido. Cada muestra fue debidamente identificada con un código que identifica a cada accesión del germoplasma boliviano.

3.3.2.2. Molido y almacenamiento de las muestras

Se procedió al molido de las muestras en un mortero previamente enfriado, añadiendo nitrógeno líquido, hasta obtener un polvo fino. Cada muestra se conservó a - 20 °C en tubos de 1.5 mL etiquetados, hasta el momento de la extracción de ADN. Se cargaron alrededor de 100 mg de la muestra molida a tubos de 1.5 mL de capacidad, identificados con el código de cada accesión. Todo el proceso de molido se realizó con nitrógeno líquido a fin de evitar la degradación del ADN en las muestras.

3.3.2.3. Extracción de ADN

Se utilizó el protocolo de extracción CTAB a fin de obtener la cantidad suficiente de ADN para realizar todos los análisis necesarios (Doyle and Doyle, 1990). La extracción de ADN consistió en la extracción con solventes orgánicos para retener solamente los ácidos nucleicos, añadiendo al final la enzima ARNasa para obtener solamente el ADN. El protocolo se detalla a continuación, se coloca entre paréntesis las modificaciones y adaptaciones realizadas para trabajar con papa:

1. Calentado del baño María a 65 °C.
2. Añadir a cada tubo de 1.5 mL con los 100 mg de tejido molido, 700 µL de tampón CTAB 2X y 2 µL de 2-mercaptoetanol, mezclar inmediatamente. Conservar los tubos en hielo.

3. Incubar las muestras en baño María a 65 °C durante 45 minutos, agitar suavemente las muestras cada 5 minutos para homogeneizar la suspensión. Mientras se incuba, preparar dos juegos de tubos de 1.5 mL para cada muestra, identificados con el código correspondiente.
4. Luego de la incubación, agregar 700 µL de cloroformo. Mezclar vigorosamente durante 5 minutos a fin de formar una emulsión homogénea.
5. Centrifugar las muestras durante 5 minutos a 10.000 r.p.m., de preferencia a 4 °C. Sacar los tubos de la centrífuga con cuidado para evitar que se mezclen las fases, transferir el sobrenadante a un tubo de 1.5 mL nuevo, teniendo cuidado de no absorber la interfase.
6. Repetir los pasos 4 y 5, es decir: añadir cloroformo, agitación y centrifugado.
7. Recuperar el sobrenadante final en un tubo de 1.5 mL estimando la cantidad recuperada. Agregar un volumen igual de isopropanol a cada tubo. Invertir los tubos vigorosamente 4 a 5 veces para precipitar el ADN.
8. Centrifugar a 10.000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente. Eliminar el sobrenadante con cuidado para no perder el precipitado de ADN.
9. Lavar el precipitado de ADN con 200 µL de etanol frío al 75% (con las muestras de papa se utilizó 400 µL). Centrifugar las muestras a 10.000 revoluciones por minuto durante 10 minutos a temperatura ambiente. Eliminar con cuidado el etanol. Este lavado se puede realizar dos veces, dependiendo del tejido (el lavado con etanol se hizo dos veces en todas las muestras a fin de eliminar sales y eventuales pigmentos).
10. Secar el precipitado dejando los tubos abiertos.
11. Disolver el precipitado en 100 µL de agua destilada estéril (utilizamos 60 µL de agua y se agregó 0,6 µL de ARNasa). Incubar en baño María a 37° C durante una hora.
12. Conservar el ADN disuelto a -20° C para su uso posterior.

3.3.2.4. Cuantificación del ADN

La cuantificación del ADN se hizo mediante electroforesis en gel de agarosa para comprobar la cantidad y calidad de ADN extraído. Este procedimiento se realizó para cada una de las accesiones:

1. Se procedió a diluir 1 μ l de la solución de ADN obtenido con 8 μ l de agua destilada y 1 μ l de tampón de carga. El tampón de carga tenía 1 ml de tampón de cargado + 8 μ l de SYBR green. Se cargó cada una de las muestras preparadas a los pocillos del gel de agarosa al 1 %.
2. Se realizó la migración horizontal de las muestras de ADN en el gel de agarosa. Luego de la migración fueron visualizados con luz U.V. y fotografiados.

La calidad y la cantidad de ADN obtenido, fue evaluado por comparación con el estándar de peso molecular utilizado (200 a 10000 pares de bases). Para las muestras que no tenían suficiente cantidad y calidad de ADN se realizó una repetición de la extracción de ADN a fin de tener suficiente material para realizar todos los análisis.

3.3.2.5. Amplificación y separación de fragmentos y matriz de datos

La amplificación y separación de fragmentos fue realizada mediante electroforesis capilar. Para la separación de fragmentos se inyectó a cada tubo capilar las muestras más el estándar de tamaño. Se utilizaron 20 pares de iniciadores específicos de papa cultivada (ver Anexo 1).

Se identificó a cada accesión de acuerdo al patrón encontrado para cada uno de los fragmentos. Se transformó la matriz de peso molecular en una matriz binaria.

3.3.3. Análisis de datos.

Se realizó un análisis exploratorio de los datos obtenidos mediante la caracterización molecular. Se identificó a cada accesión por el patrón de alelos generados. Se registró el

número de alelos encontrados para cada marcador, la frecuencia de alelos por marcador, y se calcularon los índices que permitan describir las accesiones estudiadas para estimar la diversidad existente. Se calculó el índice de polimorfismo para cada microsatélite, así como la heterocigosidad para cada locus microsatélite

3.3.3.1. Cálculo del Índice de Polimorfismo (PIC)

El cálculo del PIC se realizó según la siguiente fórmula (Botstein *et al.*, 1980):

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^n p_i^2 - \sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^n p_i^2 p_j$$

Donde:

- i = 1, 2,.....n alelos
- j = i - 1
- pi = frecuencia del i-ésimo alelo
- pj = frecuencia del j-ésimo alelo

3.3.3.2. Cálculo del Índice de Heterocigosidad

Para el Índice de Heterocigosidad se utilizaron los siguientes cálculos:

Un locus j con i alelos: $h_j = 1 - \sum p_i^2$

Promedio para varios loci: $H = \sum_j^L h_j / L$

Este último promedio también se denominó heterocigosidad promedio para los 20 loci microsatélites.

Donde:

- hj = la heterocigosidad por locus
- p y q = las frecuencias alélicas
- H = la heterocigosidad promedio para varios loci
- L = el número total de loci

3.3.3.3. Análisis de estructura genética

Se calculó la similitud entre cultivares, construyendo una matriz de similitudes entre accesiones, utilizando el coeficiente de similitud de Jaccard. Se realizó un análisis preliminar para comprender y visualizar la estructura genética de la colección en su conjunto, en base a la información molecular. Se utilizó el análisis de coordenadas principales. Se visualizó la ubicación correspondiente a cada accesión mediante el programa NTSYSpc V. 2.1.

La información morfológica proviene de la base de datos correspondiente a los cultivares del grupo *andigena*. Se exploró la correlación de los datos moleculares con los datos de caracterización morfológica, para comprender la estructura genética, mediante el análisis de escalamiento multidimensional.

Se recolectó información de evaluaciones realizadas al germoplasma, principalmente sobre respuesta a factores bióticos, realizadas en años anteriores. También se complementó con una evaluación agronómica preliminar: la respuesta de las accesiones de la subespecie *andigena* a una helada ocurrida en la etapa de floración de las plantas (Zeballos *et al.*, 2009).

3.3.4. Construcción de la colección núcleo de la subespecie *andigena*

Se procedió a la construcción de la colección representativa basada en el análisis de la caracterización molecular, para luego complementarla con la caracterización morfológica y evaluaciones realizadas, como se describe a continuación.

3.3.4.1. Análisis de la información molecular

En base al análisis coordenadas principales, se visualizó la diversidad genética de accesiones. Se visualizó la estructura dentro de la colección por su similitud genética, con el fin comprender dicha estructura, y la diversidad de la información genética obtenida.

Se realizó el análisis mediante las herramientas de escalamiento multidimensional (MDS por la sigla en inglés de Multidimensional Scaling) mediante el cual se representó en pocas dimensiones las relaciones genéticas entre los cultivares. Se obtuvo una matriz de dos dimensiones que representa las accesiones en un plano, mediante el programa PASW Statistics Versión 18.

3.3.4.2. Análisis con la información morfológica y evaluaciones agronómicas

La técnica de escalamiento multidimensional se pudo utilizar de manera complementaria con otra técnica de análisis, como es la correlación entre matrices de información molecular, con la información morfológica. La información de la caracterización morfológica y evaluaciones agronómicas proviene de la base de datos del banco de germoplasma.

De la misma manera, se añadió al análisis la información de las evaluaciones agronómicas realizadas a cada accesión. Esta complementación con la información morfológica y con las evaluaciones realizadas a las accesiones, sirvió para ayudar a comprender la relación de la caracterización molecular con la caracterización morfológica y las evaluaciones agronómicas.

3.3.4.3. Elección de accesiones y formación de la colección núcleo

Se realizó la selección de accesiones, basándose en la caracterización molecular, incorporando la información de las caracterizaciones y evaluaciones. La información utilizada fue de 29 caracteres morfológicos y 8 evaluaciones.

Se utilizaron los datos de evaluaciones de respuesta a helada, nemátodos, gorgojo, polilla, rizoctoniasis, verruga, y una evaluación de rendimiento. Falta complementar evaluaciones a factores bióticos entre un 25 a 70 % de las accesiones del germoplasma analizadas. Sin embargo, los datos existentes fueron utilizados para la selección de accesiones.

Se realizó la selección de las accesiones que formarían una colección representativa utilizando la técnica M de maximización en la búsqueda de accesiones representativas. Con la búsqueda se obtuvo el número de accesiones que retengan la diversidad alélica total en un menor número de cultivares. Se utilizó las herramientas de búsqueda del programa PowerCore Versión 1.1.

Para fines de comparación con la colección en formación se realizó además la selección de accesiones al azar entre todos los cultivares. Se comparó la colección elegida al azar con la colección núcleo.

Se comparó la colección núcleo frente a la colección original mediante los índices de diversidad, los rangos y el número de alelos. De esa manera se comprobó la representatividad de la diversidad genética de la nueva colección propuesta mediante la estrategia utilizada, respecto a la colección original de 688 accesiones del grupo *andigena*.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Extracción de ADN

El método de extracción CTAB fue el adecuado para obtener ADN de buena calidad, de foliolos de papa cultivada. Esto permitió obtener productos electroforéticos de alta calidad. La Figura 4 muestra un ejemplo de un gel de electroforesis horizontal en agarosa al 1 %, utilizado para verificar la calidad y cantidad de ADN obtenido.

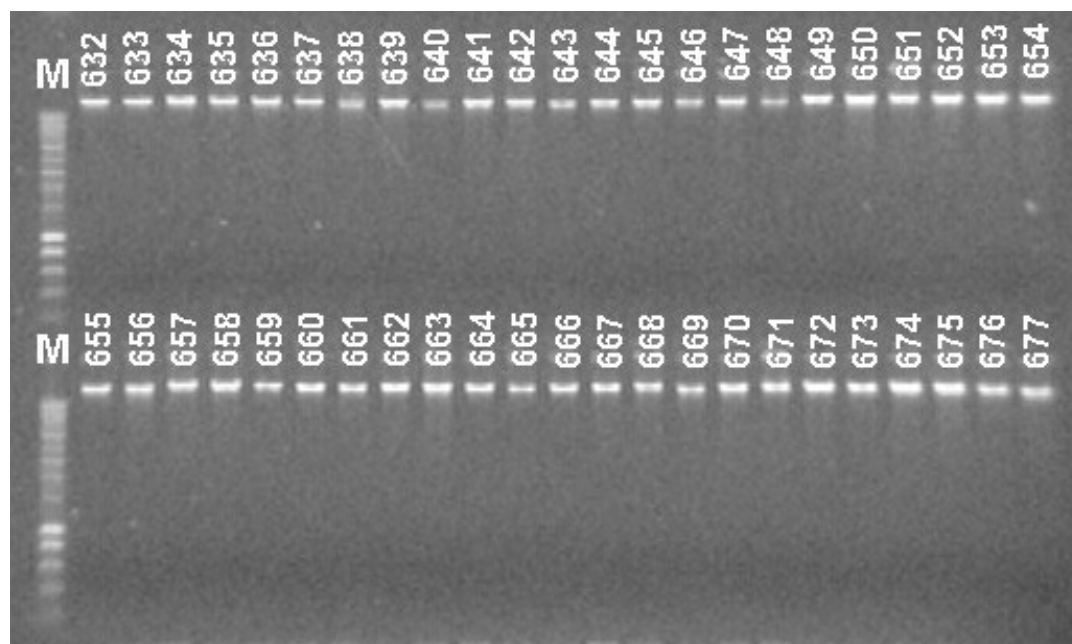


Figura 4. Ejemplo de visualización del ADN total de las accesiones. A la izquierda: M, el marcador de peso molecular de 10.000 pb

4.2. Matriz binaria de datos moleculares

Los fragmentos de los microsatélites fueron separados mediante electroforesis capilar. Con la matriz de datos resultante, se obtuvo una matriz binaria. La Tabla 6 muestra parte de la

matriz binaria obtenida. Se toma como ejemplo, el microsatélite STG0016. El tamaño de los fragmentos para este microsatélite tiene un rango de 137 a 180 pares de bases.

Tabla 6. Ejemplo de datos binarios de 15 accesiones, microsatélite STG0016

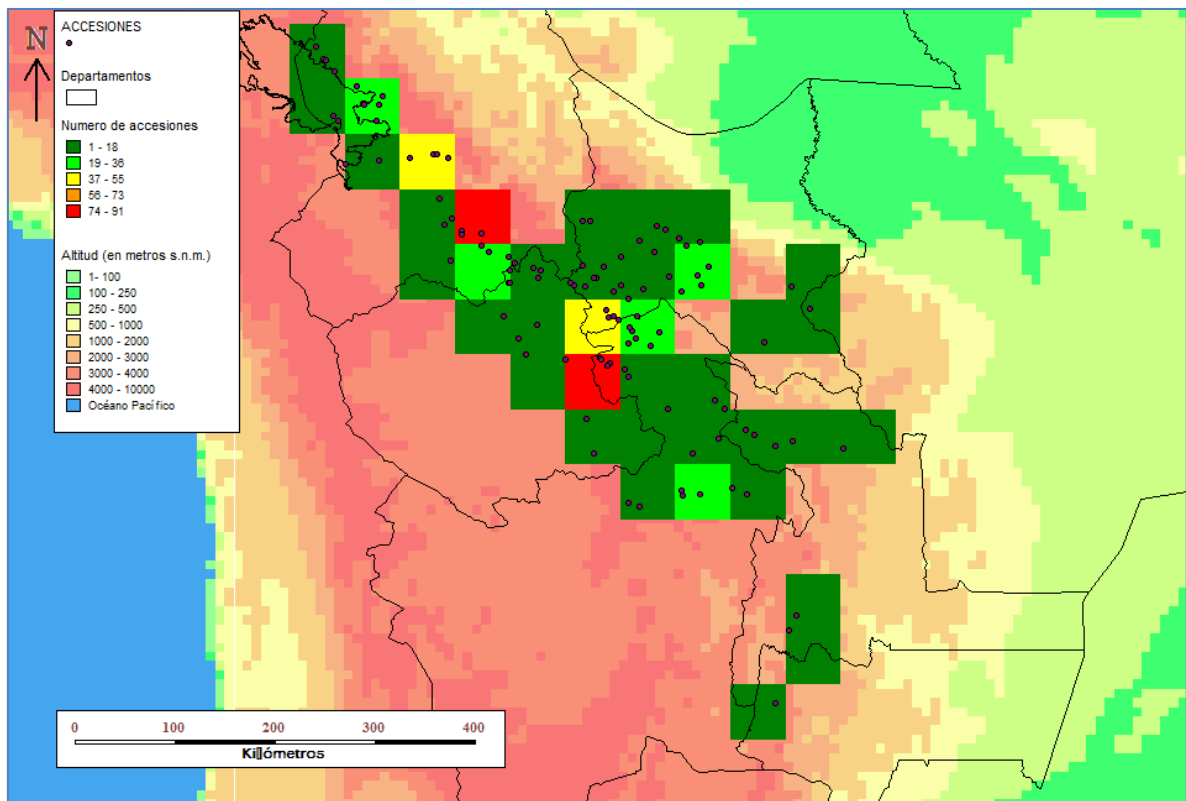
| Accesión | Tamaño de fragmentos en pares de bases (pb) | | | | | | | | | | | | | | |
|----------|---|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | 137 | 140 | 143 | 144 | 145 | 150 | 153 | 156 | 158 | 159 | 161 | 162 | 170 | 174 | 180 |
| 278 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| 279 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 280 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 281 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 282 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 283 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 284 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 285 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| 370 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 440 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 441 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| 690 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| 898 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 |
| 907 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 922 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 |

4.3. Análisis de datos

4.3.1. Distribución geográfica de las accesiones de la subespecie *andigena*

La mayor parte de las zonas productoras, de donde proviene la colección de la subespecie *andigena*, están representadas por las accesiones estudiadas. Estas zonas tienen un amplio rango de distribución de esta subespecie. Para visualizar esta distribución se utilizó el programa informático DIVA GIS Ver. 7.1.1. La representatividad geográfica de las accesiones se visualizó, según el número de accesiones por celda.

La Figura 5 muestra la distribución geográfica de accesiones de la subespecie *andigena* conservadas en el Banco de germoplasma de Bolivia. Sólo 531 de las 688 accesiones estudiadas, contaban con datos de origen geográfico para su ubicación geoespacial.



Fuente: Elaborada en base a datos de georeferenciación existentes

Figura 5. Distribución geográfica de 531 accesiones en el territorio boliviano.

Como se ve en la Figura 5, las accesiones abarcan 7 de los 9 departamentos de Bolivia con excepción de Pando y Beni. Las zonas con mayor número de accesiones, se muestran en color rojo, indicando mayor abundancia. Por ejemplo, las áreas representadas con un mayor número de accesiones son: la zona entre el Este de Oruro y el Norte del departamento de Potosí, y el sur del departamento de La Paz. Existen zonas aún no representadas.

4.3.2. Índices de diversidad y número de alelos encontrados

La Tabla 7 muestra el Índice de Polimorfismo (PIC) y la Heterocigosidad (H) para cada uno de los 20 microsatélites estudiados o SSR (abreviación de “Simple Sequence Repeat”). También se observa el número de alelos, y el rango encontrado en el tamaño de los alelos, expresado en número de pares de bases (pb), encontrados en las 688 accesiones de la subespecie *andigena*.

Tabla 7. Índices calculados y alelos encontrados para cada microsatélite

| SSR | PIC | H | N° alelos | Rango |
|------------------|--------------|--------------|-------------|---------|
| STG0016 | 0.783 | 0.805 | 15 | 137-180 |
| STM1064 | 0.497 | 0.553 | 7 | 202-213 |
| STM5114 | 0.608 | 0.674 | 7 | 302-318 |
| STM1053 | 0.498 | 0.585 | 8 | 182-214 |
| STG0010 | 0.667 | 0.716 | 8 | 177-190 |
| STI0001 | 0.548 | 0.614 | 12 | 190-216 |
| STI0012 | 0.716 | 0.752 | 17 | 173-240 |
| STI0032 | 0.579 | 0.644 | 9 | 127-143 |
| STPoAc58 | 0.547 | 0.589 | 8 | 231-257 |
| STM0019 | 0.629 | 0.681 | 15 | 175-251 |
| STI0004 | 0.622 | 0.653 | 16 | 92-123 |
| STI0033 | 0.616 | 0.644 | 16 | 120-163 |
| STM1104 | 0.831 | 0.849 | 13 | 180-198 |
| STM1052 | 0.763 | 0.791 | 19 | 201-277 |
| STI0014 | 0.467 | 0.519 | 6 | 136-149 |
| STG0025 | 0.515 | 0.574 | 7 | 121-221 |
| STM1106 | 0.575 | 0.591 | 13 | 145-212 |
| STG0001 | 0.703 | 0.740 | 17 | 136-159 |
| STM0037 | 0.823 | 0.839 | 18 | 88-133 |
| STI0030 | 0.775 | 0.799 | 16 | 101-224 |
| PROMEDIOS | 0.638 | 0.681 | 12.4 | |

El promedio del PIC es 0.638 y la heterocigosidad promedio 0.681. El número promedio de alelos por locus microsatélite, es 12,4. Los 20 microsatélites contienen un polimorfismo elevado y revelan alta diversidad genética en esta colección.

Esto confirma tanto la riqueza como la complejidad genética que se conserva en este grupo de cultivares estudiados. Huamán y Spooner (2002) también hallan que esa diversidad y complejidad, es característica de esta subespecie.

Sin embargo, los mismos autores añaden que se debe recurrir a conjunto integral de herramientas técnicas para la caracterización del germoplasma, en particular en esta subespecie. Esto se debe a la complejidad genética observada, la existencia de ploidía diferente, y la mezcla con las especies más emparentadas a esta subespecie.

4.3.3. Análisis de coordenadas principales

Para los análisis multivariados, se utilizó la matriz de similitudes calculada en base el coeficiente de similitud de Jaccard. Con el análisis de coordenadas principales se visualiza la diversidad genética conservada en las accesiones de la subespecie *andigena* (Figura 6).

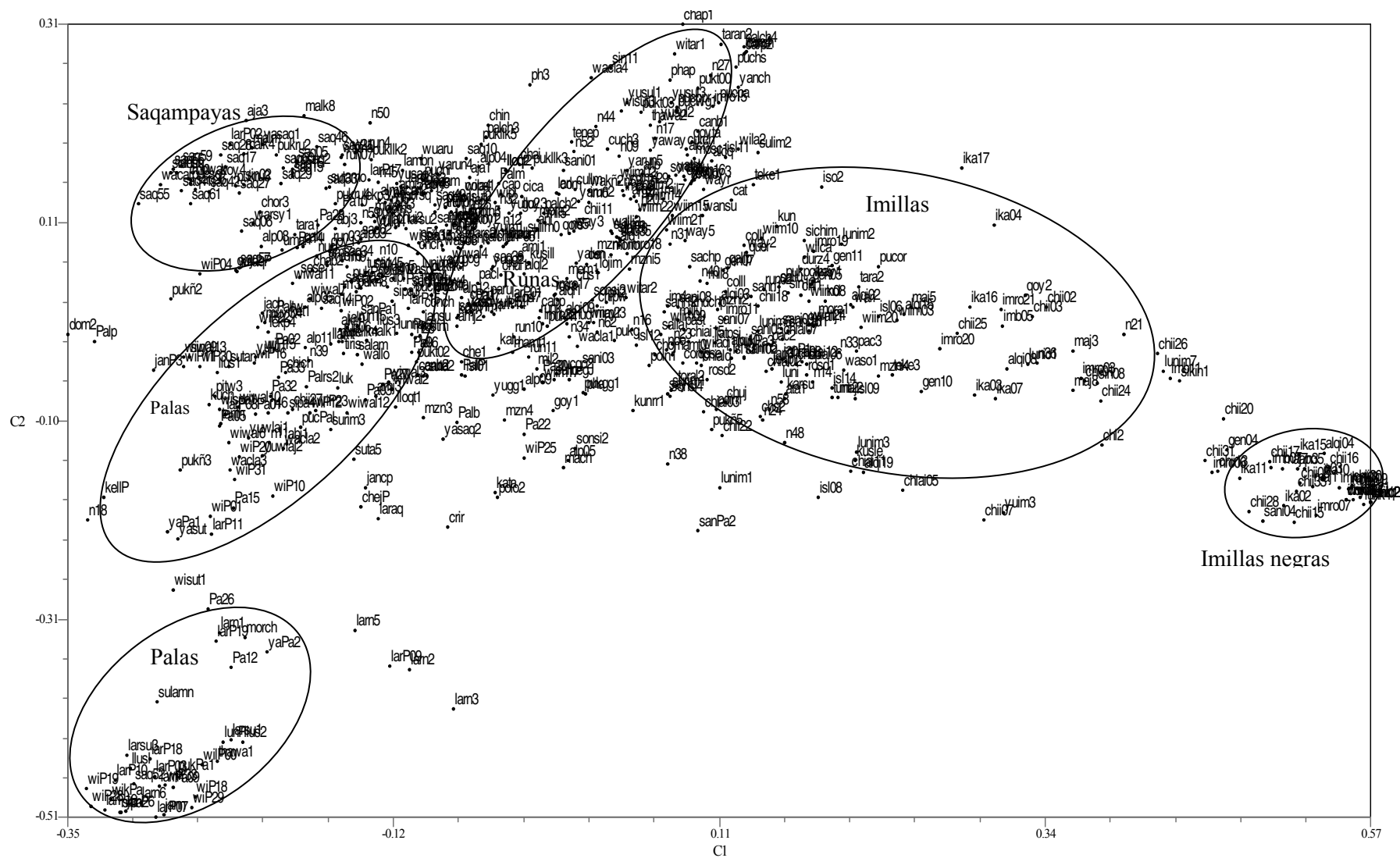


Figura 6. Agrupación de accesiones por su similitud genética.

Se marcaron algunos grupos de accesiones. Análisis de coordenadas principales mediante el programa NTSYSpc Ver. 2.1

En la Figura 6 se observa la alta diversidad genética conservada en las 688 accesiones. Para su visualización, se ha utilizado los nombres comunes abreviados de las accesiones. Las líneas trazadas alrededor de algunos grupos de accesiones, señalan tendencias de agrupación de accesiones por su similitud genética. Sin embargo, debido a la complejidad de la nube de puntos formada por las accesiones, tales grupos no se aprecian claramente.

Los grupos de accesiones que llevan el mismo nombre nativo, en varios casos, forman diferentes grupos de similitud genética dentro de la subespecie *andigena*. Por ejemplo, existen grupos de accesiones que por su nombre común tienden a agruparse como “Palis o Palas”, “Saqampayas”, “Imillas”, o “Runas”.

Esto permite constatar que las accesiones conservadas a lo largo de muchos años, han mantenido su identidad, como es el caso de esta colección. También se observa que los grupos se entremezclan, lo que se debería principalmente a la hibridación ocurrida en sus sitios de origen y desarrollo, por lo que comparten caracteres similares.

Debido a que existe complejidad en la formación de grupos, la selección de la colección núcleo se realizó de manera conjunta, como un solo grupo, en las 688 accesiones. Además, en el futuro, es necesario complementar las caracterizaciones y evaluaciones agronómicas.

4.4. Construcción de la colección núcleo de las accesiones de la subespecie *andigena*

4.4.1. Análisis de información molecular y caracteres morfológicos

El método de escalamiento multidimensional (MDS) permitió representar las relaciones entre las accesiones en un plano de dos dimensiones, a través de la utilización de la matriz de similitudes, construida en base al Coeficiente de Jaccard. Se utilizó para ello la herramienta PROXSCAL del programa Pasw Statistics 18.

El resultado del análisis permitió representar a las 688 accesiones, por sus relaciones de similitud genética, en un plano de dos dimensiones, denominadas DIM 1 y DIM 2. La Figura 7 muestra la disposición de las accesiones, con sus nombres respectivos abreviados.

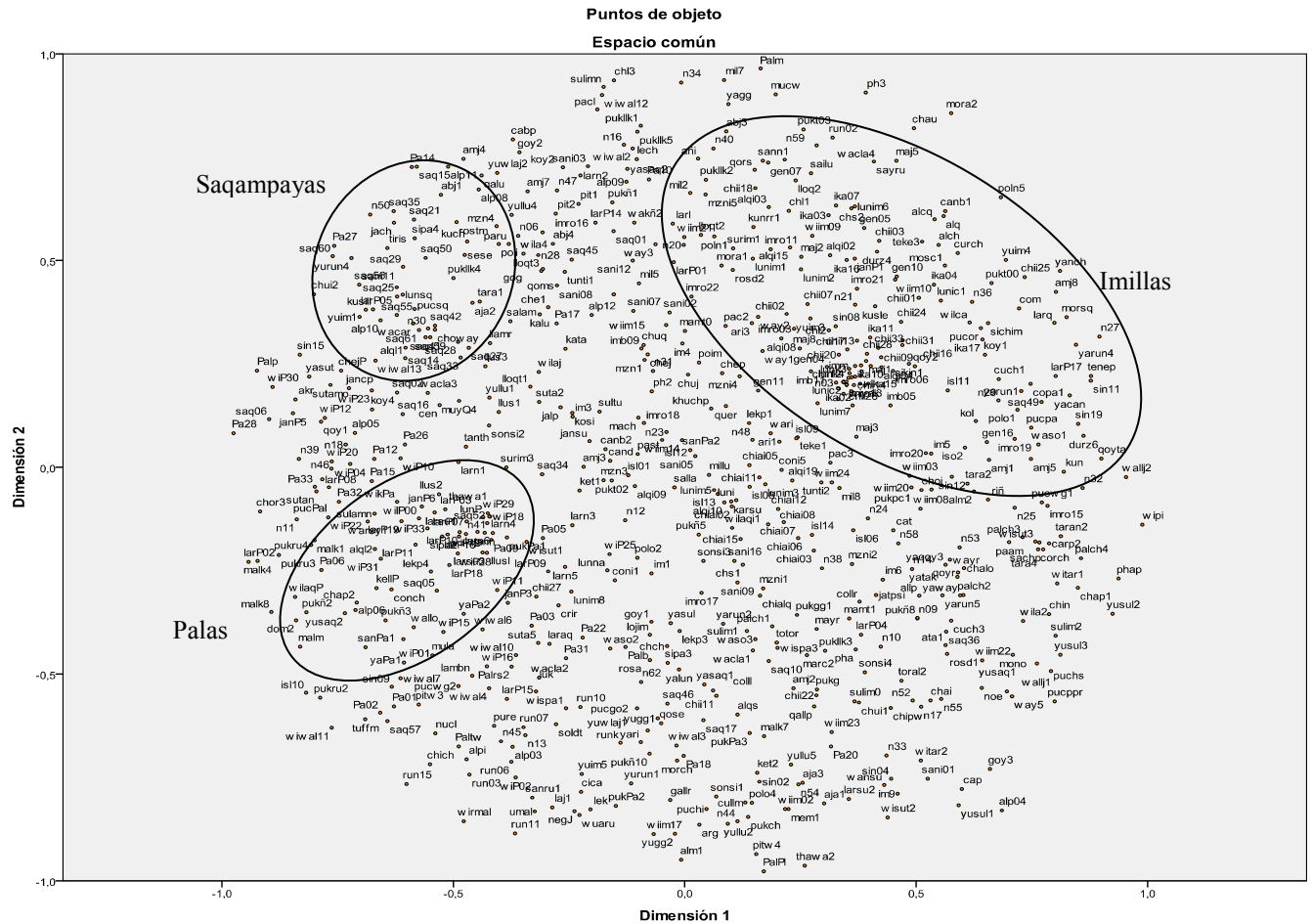


Figura 7. Representación de las accesiones en un espacio común con el método de escalamiento.

En la Figura 7 se marcaron algunos grupos de cultivares para mostrar su ubicación. Se puede ver la orientación de las accesiones dispuesta en el plano. Esta semejanza de distribución en un plano de dos dimensiones, con dos técnicas distintas, escalamiento multidimensional (Figura 7) y coordenadas principales (Figura 6), confirma la consistencia del análisis de ordenación de las accesiones por su similitud genética.

Las coordenadas obtenidas, mediante la herramienta PROXSCAL, sirvieron para relacionar las variables del análisis molecular con otras variables provenientes de las caracterizaciones y evaluaciones. Se realizó un análisis de correlación entre las dos dimensiones (DIM 1 y DIM 2) de cada punto y las caracterizaciones. Se eligieron para su visualización, aquellos caracteres morfológicos que muestran mayor correlación con la diversidad genética revelada en los microsatélites. La correlación se muestra en la Tabla 8 y Figura 8.

Tabla 8. Caracteres de mayor significación en el espacio común de las accesiones

| Dimensiones | TUBÉRCULO | | | | | TALLO | FLOR |
|-------------|-----------------------------|---------------------|----------------------------|--|------------------------------|-----------------|----------------------------|
| | Forma general del tubérculo | Profundidad de ojos | Color principal de la piel | Distribución del color secundario de la piel | Color secundario de la pulpa | Color del tallo | Color principal de la flor |
| | FGR | POJ | CPPL | DSCPL | CSPL | CTL | CPF |
| DIM 1 | -0.26** | 0.44** | 0.22** | -0.26** | 0.19** | 0.33** | -0.07 |
| DIM 2 | -0.04 | 0.09* | 0.13** | -0.03 | -0.02 | -0.01 | -0.11** |

Los caracteres morfológicos con la mayor correlación en el análisis son 6, en el siguiente orden: profundidad de ojos, forma general del tubérculo, color principal de la piel, distribución del color secundario de la piel, color secundario de la pulpa, color del tallo, y color principal de la flor. La Figura 8, muestra la disposición y tendencia de los 6 caracteres morfológicos en el plano.

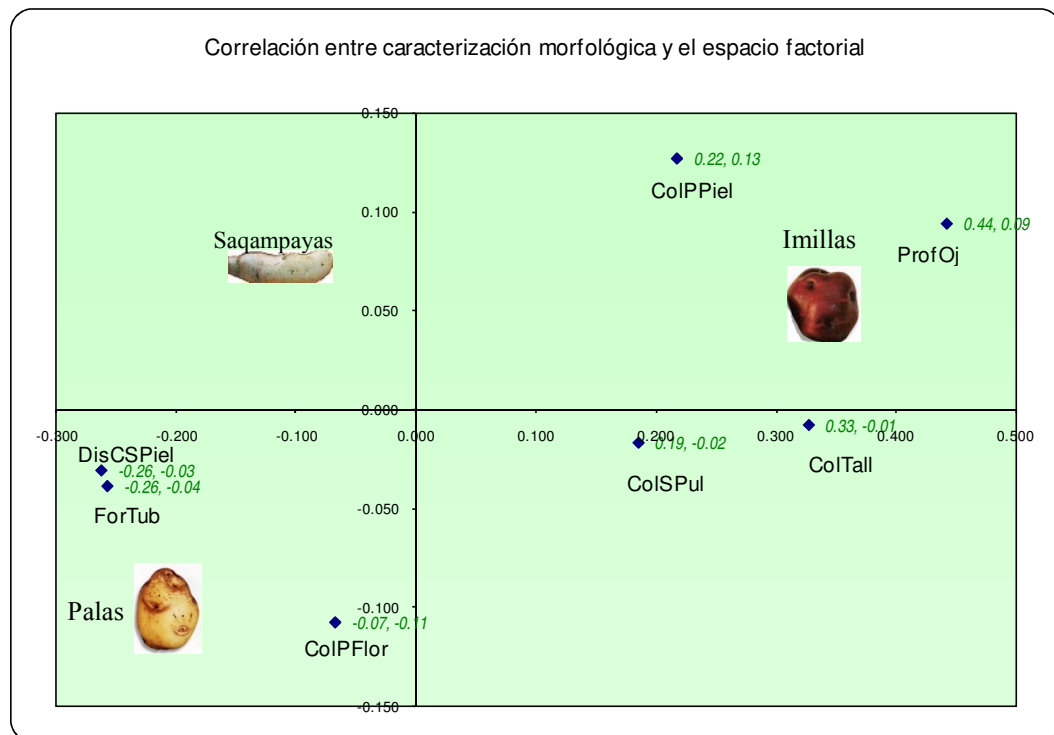


Figura 8. Tendencia de los caracteres más significativos en el espacio común

Se puede ver en la Tabla 8, como en la Figura 8, que la dimensión horizontal o dimensión 1 (DIM 1) lleva la mayoría de los caracteres expresados en el espacio común del análisis. A la derecha del gráfico se encuentran las accesiones con mayor profundidad de ojos, coloración del tallo, coloración principal de la piel, y coloración secundaria de la pulpa del tubérculo.

Hacia la izquierda se hallan las accesiones con una forma del tubérculo más alargada, y una distribución del color secundario de la piel más dispersa. Por otro lado, en la dimensión vertical o DIM 2, se observa que las accesiones con un color más oscuro de la flor se encuentran más hacia abajo del gráfico.

Esta disposición espacial, sugiere que las caracterizaciones molecular y morfológica tienen relación mutua y se complementan entre sí. Por esta razón, ambas caracterizaciones se deben analizar conjuntamente al seleccionar la colección núcleo.

Todos los demás caracteres, de los 29 analizados, mostraron menor y diferente grado de correlación con la información genética expresada en el plano. Sin embargo, ello no sugiere descartarlos para la selección de la colección núcleo, ya que son también informativos, en la medida que expresan la información genética de cada accesión.

4.4.2. Análisis de correlación con las evaluaciones agronómicas

El análisis de correlación con las evaluaciones agronómicas, también ayuda a comprender la colección total. Existe correlación entre la caracterización molecular con la respuesta a algunos factores bióticos y abióticos analizados, aunque existe influencia ambiental en el caso de las evaluaciones agronómicas. La representación de las relaciones genéticas entre accesiones, muestran tendencias que agrupan a las accesiones por sus características morfológicas y su respuesta en las evaluaciones realizadas.

En la Figura 9 se visualiza las correlaciones de 3 evaluaciones agronómicas y de los caracteres morfológicos, en relación al espacio de dos dimensiones. Las accesiones con mayor susceptibilidad a la helada están a la izquierda, en la dimensión 1, y la

susceptibilidad a nemátodos es mayor hacia la derecha. Aunque estas correlaciones sugieren una tendencia, se requiere un análisis más detallado de la expresión genética, pues existe una diversidad de respuesta de cada accesión a los diferentes factores evaluados.

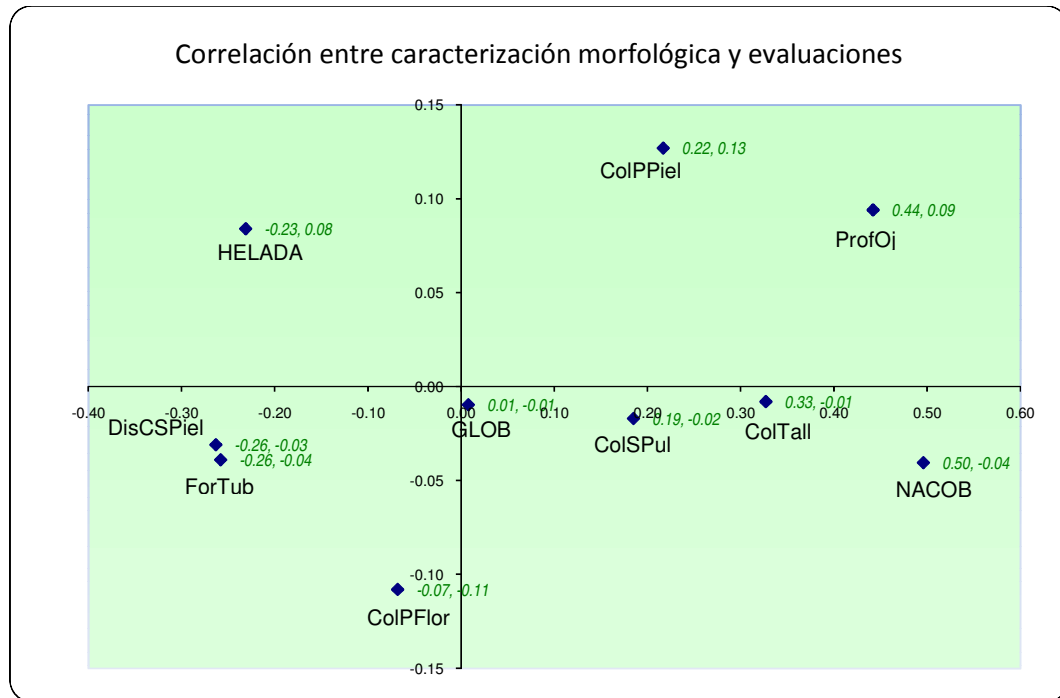


Figura 9. Tendencia de las evaluaciones agronómicas en el espacio común

Este análisis sugiere que la información preliminar de respuesta a heladas, puede ser de ayuda para encontrar accesiones con mayor tolerancia a este factor. Las accesiones de la subespecie andigena poseen importante información genética como una respuesta a las bajas temperaturas provocadas por el cambio climático. La respuesta a nemátodos sugiere una tendencia, y debe ser complementada mediante evaluaciones, al resto de las accesiones.

4.4.3. Formación de la colección núcleo de la subespecie *andigena*

La estrategia de muestreo más eficaz para la selección de accesiones, con el mayor número de alelos y el menor número de redundancias, es la llamada estrategia M o de maximización. Al obtener la colección núcleo, se realizó una selección del 100 % de alelos observados, en el menor número de accesiones. Según Kim *et al.* (2007), este resultado ha

sido también obtenido en otros estudios, al conformar una colección núcleo reteniendo el 100 % de alelos con el método de maximización M, con ayuda del programa PowerCore.

La diversidad retenida fue del 100 % de los alelos de las 688 accesiones. Se obtuvo mediante la estrategia M, una colección núcleo de 114 accesiones que retiene todos los alelos de esta colección, así como la diversidad expresada por los caracteres morfológicos y las evaluaciones agronómicas.

En la Figura 10 se muestra la ventana del programa PowerCore, durante la búsqueda de accesiones representativas. Esta búsqueda ha permitido retener la diversidad de los alelos de todo el conjunto de accesiones analizado.

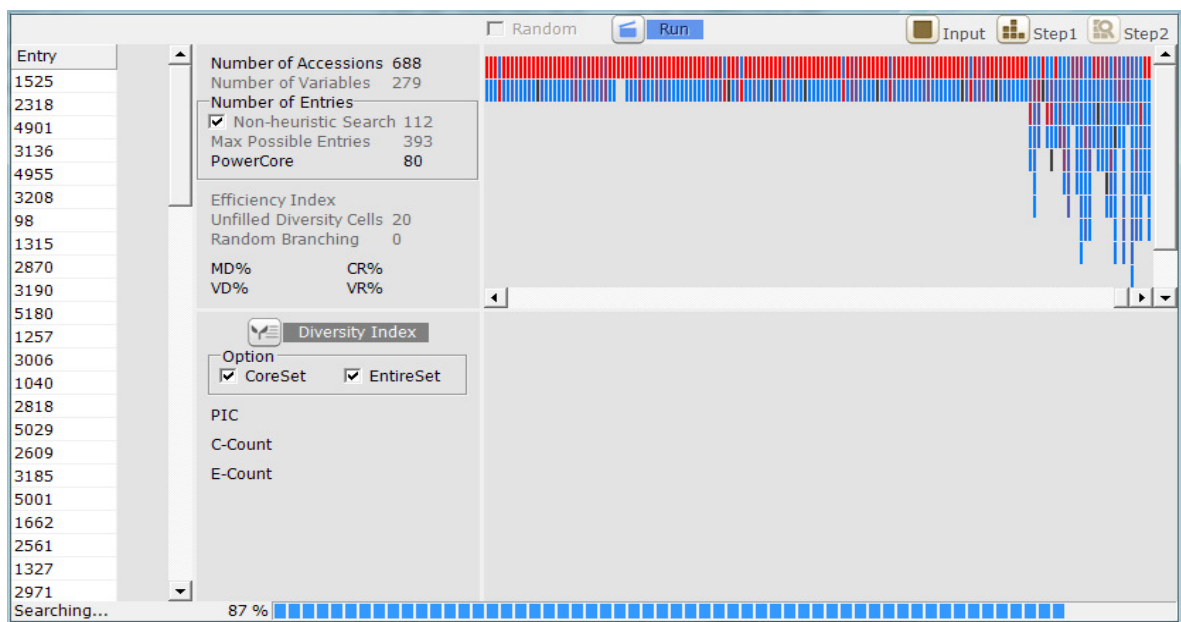


Figura 10. Ventana que muestra el programa PowerCore al realizar la búsqueda mediante el método M de maximización de la diversidad retenida.

La Tabla 10 muestra la lista de las 114 accesiones elegidas con ayuda del programa PowerCore, que permitió asegurar la retención del 100 % de los alelos de la colección original. Son 114 accesiones elegidas con la estrategia de maximización (M), que representa un 16 % del conjunto total de 688 cultivares. En la Tabla 10, además, se señala el origen geográfico, nombre de la accesión, nombre abreviado y código respectivo.

Tabla 9. Colección núcleo de 114 accesiones de la subespecie *andigena*

| Depto. | Provincia | Nombre local | Nom.corto | COD | Depto. | Provincia | Nombre local | Nom.corto | COD |
|------------|-----------------------|--------------------|-----------|------|----------|-----------------------|---------------------|-----------|------|
| Cochabamba | sin dato | PUKA LLOKALLA | pukllk1 | 98 | La Paz | Pedro Domingo Murillo | LARAM LUKI | larlu | 3798 |
| Cochabamba | Tiraque | WAYCHA | way4 | 1040 | Oruro | sin dato | ALQA LLUSTA | alqll2 | 179 |
| Cochabamba | Cercado | ICARI | ika5 | 1042 | Oruro | Cercado | SAQAMPAYA | saq12 | 182 |
| Cochabamba | Arque | PALA | Pa07 | 2609 | Oruro | Eduardo Avaroa | LEKE | leke | 1210 |
| Cochabamba | Bolivar | CHURCA IMILLA | chri2 | 2631 | Oruro | Tomás Barrón | POLONIA | poln2 | 1427 |
| Cochabamba | Esteban Arce | PIÑU | piñu | 2653 | Oruro | Cercado | LUNKA IMILLA | lunki5 | 1435 |
| Cochabamba | Bolivar | PALI | Pali3 | 2676 | Oruro | Saucari | SAQAMPAYA | saq14 | 1461 |
| Cochabamba | Arque | CHURCA IMILLA | chri1 | 2716 | Potosí | Tomás Frías | IMILLA NEGRA | imin09 | 1056 |
| Cochabamba | Quillacollo | sin dato | n24 | 2741 | Potosí | Chayanta | LLUSTA | llus2 | 1207 |
| Cochabamba | Chapare | YANA CANCHIRI | yacan | 2747 | Potosí | Chayanta | WILA WAKA LAJRA | wiwal7 | 1257 |
| Cochabamba | Arque | ARICHUA | arich | 2759 | Potosí | Rafael Bustillo | YURAJ IMILLA | yuim4 | 1662 |
| Cochabamba | Carrasco | QOSEÑA | qose | 2867 | Potosí | Cornelio Saavedra | ALQA PALA | alp04 | 2804 |
| Cochabamba | Tiraque | RUNA | run06 | 2870 | Potosí | José María Linares | QOYU QOYU | goqyq | 2812 |
| Cochabamba | Narciso Campero | SAYRURA PAPA | sayru | 3129 | Potosí | Tomás Frías | PALTA WAYKU | paltw | 2996 |
| Cochabamba | Tapacari | JANQO COPACABANA | janqp | 3156 | Potosí | Chayanta | LARAM NAIRA | larn2 | 3221 |
| Cochabamba | Carrasco | PUKA RUNA | pukru1 | 3772 | Potosí | Rafael Bustillo | KUNU | kunu | 3247 |
| Cochabamba | Tiraque | MONO MAQUI | mono | 3803 | Potosí | Rafael Bustillo | PAPA CHILENA | pacl | 4847 |
| Cochabamba | Bolivar | ISLA | isl5 | 3822 | Potosí | Rafael Bustillo | YANA WAYCU | yaway | 4862 |
| Cochabamba | Bolivar | CHIYAR IMILLA | chii09 | 3823 | Potosí | Rafael Bustillo | WALLPA JINCHO | wallj1 | 4877 |
| Cochabamba | Bolívar | MILAGRO | mil3 | 3831 | Potosí | Rafael Bustillo | PHAPHU PAPA | phap | 4912 |
| Cochabamba | Bolivar | PALA | Pa09 | 3834 | Potosí | Rafael Bustillo | YURAJ RUNA | yurun2 | 4941 |
| Cochabamba | Bolivar | MANZANA IMILLA | mzni4 | 3836 | Potosí | Rafael Bustillo | CHILENO | chlo | 4946 |
| Cochabamba | Bolívar | CHIYAR IMILLA | chii10 | 3841 | Potosí | Rafael Bustillo | PUCA GOYU | pukg | 4953 |
| Cochabamba | Bolivar | WILA IMILLA | wiim08 | 3846 | Potosí | Rafael Bustillo | YANA SAKAMPAYA | ysaq2 | 4954 |
| Chuquisaca | Oropeza | SULMANA NEGRA | sulimm | 2815 | Potosí | Rafael Bustillo | SOLDADITO | soldt | 4955 |
| Chuquisaca | Oropeza | PALI PALI | PalPi | 2818 | Potosí | Rafael Bustillo | MUCU WAYCO | mucw | 4981 |
| Chuquisaca | Yamparáez | CAPIRO | capi | 2830 | Potosí | Rafael Bustillo | CABADA PAPA | cabp | 4983 |
| Chuquisaca | Oropeza | sin dato | n26 | 2846 | Potosí | Rafael Bustillo | TENEKEA PAPA | tenep | 4990 |
| La Paz | Omasuyos | AMAJAYA | amjy1 | 13 | Potosí | Rafael Bustillo | YURAJ SAKAMPAYA | yusaq2 | 4998 |
| La Paz | sin dato | KUSI LEULE | kusle | 17 | Potosí | Rafael Bustillo | WACA LLOCO | wallo | 4999 |
| La Paz | Omasuyos | LUNKA IMILLA | lunki1 | 18 | Potosí | Rafael Bustillo | YURAJ IMILLA | yuim3 | 5001 |
| La Paz | Omasuyos | CHINCHA CHIYAR | chich | 23 | Potosí | Rafael Bustillo | YANA CHUJLLU | yanch | 5021 |
| La Paz | Aroma | GENDARME | gen02 | 35 | Potosí | Rafael Bustillo | LUNKU NATIVIRA | lunna | 5029 |
| La Paz | Omasuyos | RUNA | run01 | 157 | Potosí | Rafael Bustillo | YURAJ GOYUGOYU | yugg2 | 5031 |
| La Paz | Omasuyos | TARAKO | taral | 186 | Potosí | Rafael Bustillo | MARCOS PINTARO | marco | 5038 |
| La Paz | Pedro Domingo Murillo | RUNA | run02 | 1163 | Potosí | Alonso de Ibáñez | QOYLLU TAKA | qoyta | 5168 |
| La Paz | Los Andes | KUNURARA | kunrr | 1195 | Potosí | Alonso de Ibáñez | CHAUCHA | chau | 5179 |
| La Paz | sin dato | AJAHUURI | aja1 | 1283 | Potosí | Alonso de Ibáñez | YURAC SULMANA | yusul0 | 5180 |
| La Paz | Aroma | DURAZNILLO | durz1 | 1298 | sin dato | sin dato | LARAM PALI | larPi09 | 206 |
| La Paz | Pedro Domingo Murillo | CHIYAR IMILLA | chii03 | 1300 | sin dato | sin dato | YANA LUNKA | yalun | 1097 |
| La Paz | Pedro Domingo Murillo | TUNTA IMILLA | tunta | 1306 | sin dato | sin dato | sin dato | n32 | 1543 |
| La Paz | Pedro Domingo Murillo | LARAM PALI | larPi01 | 1315 | sin dato | sin dato | WILA WAKA LAJRA | wiwal8 | 2137 |
| La Paz | Aroma | WILA IMILLA | wiim03 | 1350 | sin dato | sin dato | PALA | Pa12 | 2318 |
| La Paz | Aroma | ALQA PALA | alp01 | 1525 | sin dato | sin dato | WILA IMILLA | wiim11 | 2380 |
| La Paz | Aroma | LUNKA ICARI | lunic2 | 1571 | sin dato | sin dato | MALKACHO | malk3 | 2444 |
| La Paz | Aroma | MAJARILLO | maj2 | 2905 | sin dato | sin dato | PALA | Pa13 | 2524 |
| La Paz | Aroma | ALQA PALU | alPu | 2924 | sin dato | sin dato | YURAJ LLUSTA | yullust | 2561 |
| La Paz | Pedro Domingo Murillo | sin dato | n03 | 3006 | sin dato | sin dato | KETU | ket2 | 2722 |
| La Paz | Pedro Domingo Murillo | PALA | Pa02 | 3059 | sin dato | sin dato | CENTEÑA | cent | 2956 |
| La Paz | Pedro Domingo Murillo | PUKA NAWI | pukñ2 | 3072 | sin dato | sin dato | SAQAMPAYA | saq30 | 2971 |
| La Paz | Pedro Domingo Murillo | WISLLA PAQUI | wispa1 | 3085 | sin dato | sin dato | LARAM PALA | larPa6 | 2976 |
| La Paz | Pedro Domingo Murillo | LARAM PALI | larPi04 | 3102 | sin dato | sin dato | sin dato | n43 | 3115 |
| La Paz | Aroma | WILA WAKA LAJRA | wiwal4 | 3615 | sin dato | sin dato | IMILLA ROSADA | imros7 | 3190 |
| La Paz | Aroma | sin dato | n07 | 3621 | sin dato | sin dato | PUKA RUNA | pukru3 | 3263 |
| La Paz | Aroma | CHIYAR ALQA IMILLA | chiai05 | 3644 | sin dato | sin dato | WIRA MALCACHO | wirmal | 5190 |
| La Paz | Aroma | MAYRURU | mayr | 3666 | sin dato | sin dato | MALCACHO MIRKA MAYU | malmm | 5194 |
| La Paz | Aroma | sin dato | n13 | 3681 | sin dato | sin dato | AMAJAYA | amjy5 | 5206 |

La Figura 11 presenta un dendograma visualizando la estructura de la colección núcleo obtenida. Se identifica a las 114 accesiones por su nombre local.



Figura 11. Visualización de la colección núcleo generada de 114 accesiones

Se observa que la colección núcleo, conserva la estructura de la colección original (dendograma de las 688 accesiones, en el Anexo 2). La similitud entre cultivares está entre 0.28 y 0.95, y no se presentan redundancias. Las accesiones con similitud mayor a 0.9,

tienen diferencias, según la información de la caracterización morfológica, así como de las evaluaciones agronómicas.

Para la comparación con la colección núcleo en formación, también se generó una colección núcleo al azar, de las 688 accesiones,. Se obtuvo 115 accesiones elegidas al azar, que representan un 16,7 % del total de la población original. La Figura 12 muestra el dendograma de las 115 accesiones elegidas al azar.

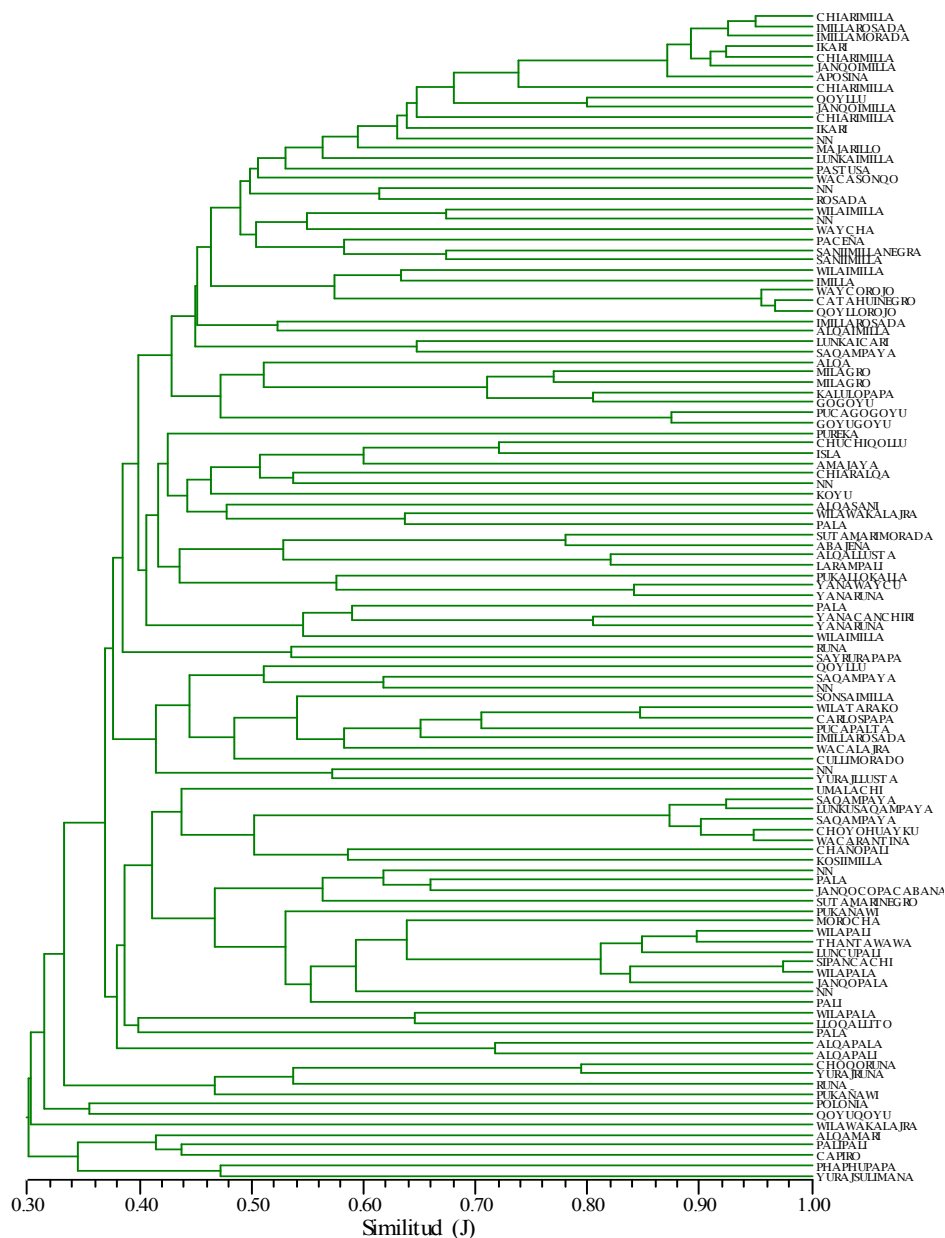


Figura 12. Colección generada al azar de 115 cultivares de la subespecie *andigena*.

En esta colección núcleo generada al azar, se puede ver que no se conserva una estructura similar a la de la colección núcleo, debido principalmente a que el muestreo al azar no busca la optimización que se necesita. Su representatividad es reducida, con una pérdida de 74 alelos, de los 247 alelos de toda la colección, lo que resulta en la retención solamente de un 70 % de los alelos. Además presenta mayor redundancia de accesiones, por lo que la información de evaluaciones y caracterizaciones no está representada de manera óptima.

En la Tabla 10 se compara la colección núcleo con la colección original. Se ha calculado el índice de polimorfismo (PIC), la heterocigosidad (H), el rango y número de alelos por microsatélite. El número y el rango de alelos de la colección núcleo y la colección original se han conservado igual. Se ha resaltado en negrilla los valores de la colección núcleo.

Tabla 10. Comparación entre la colección núcleo y la colección original

| COMPARACIÓN DE DIVERSIDAD ENTRE LA COLECCIÓN NÚCLEO Y LA COLECCIÓN ORIGINAL | | | | | | | INDICES DE LA COLECCIÓN AL AZAR | | | |
|---|-----------------------------|---------------------------|---------------------------|-------------------------|-------------------------------|---------------------------|---------------------------------|--------------|-------------------------|---------------------|
| SSR | PIC (Colección original) | PIC (Colección Núcleo) | H (Colección original) | H (Colección Núcleo) | N° alelos (igual en ambas) | Rango (igual en ambas) | PIC | H | Cambios en N° de alelos | Cambios en el rango |
| STG0016 | 0.783 | 0.779 | 0.805 | 0.802 | 15 | 137-180 | 0.774 | 0.797 | 11 | 137-174 |
| STM1064 | 0.497 | 0.534 | 0.553 | 0.587 | 7 | 202-213 | 0.494 | 0.552 | 6 | |
| STM5114 | 0.608 | 0.631 | 0.674 | 0.692 | 7 | 302-318 | 0.609 | 0.673 | 6 | |
| STM1053 | 0.498 | 0.529 | 0.585 | 0.605 | 8 | 182-214 | 0.504 | 0.590 | 6 | 182-193 |
| STG0010 | 0.667 | 0.717 | 0.716 | 0.755 | 8 | 177-190 | 0.655 | 0.706 | 6 | 177-185 |
| STI0001 | 0.548 | 0.639 | 0.614 | 0.686 | 12 | 190-216 | 0.549 | 0.614 | 9 | |
| STI0012 | 0.716 | 0.750 | 0.752 | 0.779 | 17 | 173-240 | 0.706 | 0.743 | 10 | 184-218 |
| STI0032 | 0.579 | 0.649 | 0.644 | 0.699 | 9 | 127-143 | 0.588 | 0.650 | 7 | |
| STPoAc58 | 0.547 | 0.573 | 0.589 | 0.614 | 8 | 231-257 | 0.563 | 0.604 | 6 | 247-257 |
| STM0019 | 0.629 | 0.724 | 0.681 | 0.755 | 15 | 175-251 | 0.590 | 0.650 | 8 | 175-249 |
| STI0004 | 0.622 | 0.675 | 0.653 | 0.699 | 16 | 92-123 | 0.606 | 0.639 | 9 | 95-123 |
| STI0033 | 0.616 | 0.680 | 0.644 | 0.702 | 16 | 120-163 | 0.644 | 0.675 | 10 | 120-163 |
| STM1104 | 0.831 | 0.845 | 0.849 | 0.861 | 13 | 180-198 | 0.814 | 0.835 | 11 | 183-198 |
| STM1052 | 0.763 | 0.802 | 0.791 | 0.822 | 19 | 201-277 | 0.772 | 0.798 | 8 | 215-273 |
| STI0014 | 0.467 | 0.505 | 0.519 | 0.557 | 6 | 136-149 | 0.448 | 0.499 | 5 | |
| STG0025 | 0.515 | 0.524 | 0.574 | 0.573 | 7 | 121-221 | 0.526 | 0.586 | 5 | 216-221 |
| STM1106 | 0.575 | 0.707 | 0.591 | 0.725 | 13 | 145-212 | 0.604 | 0.624 | 11 | |
| STG0001 | 0.703 | 0.743 | 0.740 | 0.769 | 17 | 136-159 | 0.706 | 0.743 | 12 | |
| STM0037 | 0.823 | 0.854 | 0.839 | 0.865 | 18 | 88-133 | 0.830 | 0.846 | 15 | 88-132 |
| STI0030 | 0.775 | 0.800 | 0.799 | 0.819 | 16 | 101-224 | 0.777 | 0.802 | 12 | 103-224 |
| PROMEDIOS | 0.638 | 0.683 | 0.681 | 0.718 | 12.4 | | 0.638 | 0.681 | 8.7 | |

Los índices de diversidad de la colección núcleo son superiores a los de la colección original, porque se han reducido las redundancias, por lo tanto, las frecuencias alélicas son mayores.

Se puede ver que la representatividad de la colección núcleo, es consistente, considerando que tiene una estructura tan diversa y compleja, como es el caso de la subespecie *andigena*. La diversidad genética en la colección núcleo se mantiene, y las accesiones representativas retienen el 100 % de los alelos de toda la colección estudiada. Además, se ha reducido la redundancia al mínimo.

La Figura 13, muestra la distribución en un espacio de 3 dimensiones de la colección núcleo resultante. La nube de puntos representa a las 688 accesiones estudiadas, y los nombres abreviados de los cultivares, representan a las 114 accesiones de la colección núcleo, para su mejor visualización en el gráfico. Esta distribución de la colección núcleo en un espacio de 3 dimensiones, se ha visualizado mediante análisis de coordenadas principales, utilizando el programa NTSYSpc.

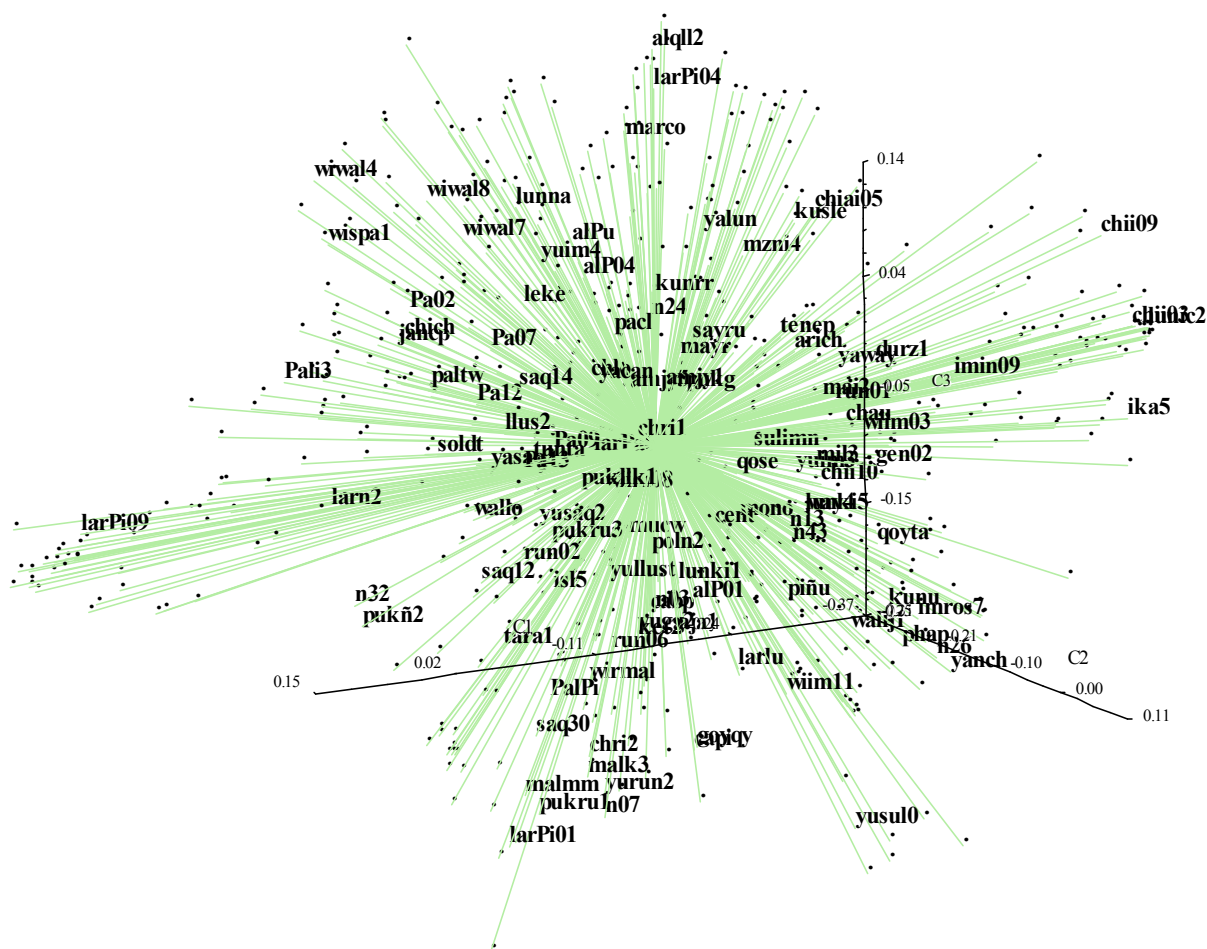


Figura 13. Distribución de la colección núcleo de la subespecie *andigena*.

La Figura 13 muestra la disposición de las accesiones en el espacio, con el eje 3 dispuesto en forma vertical. Para mostrar otra perspectiva de esta distribución, en la Figura 14 se ve el mismo gráfico con la disposición del eje 3 inclinado hacia el frente.

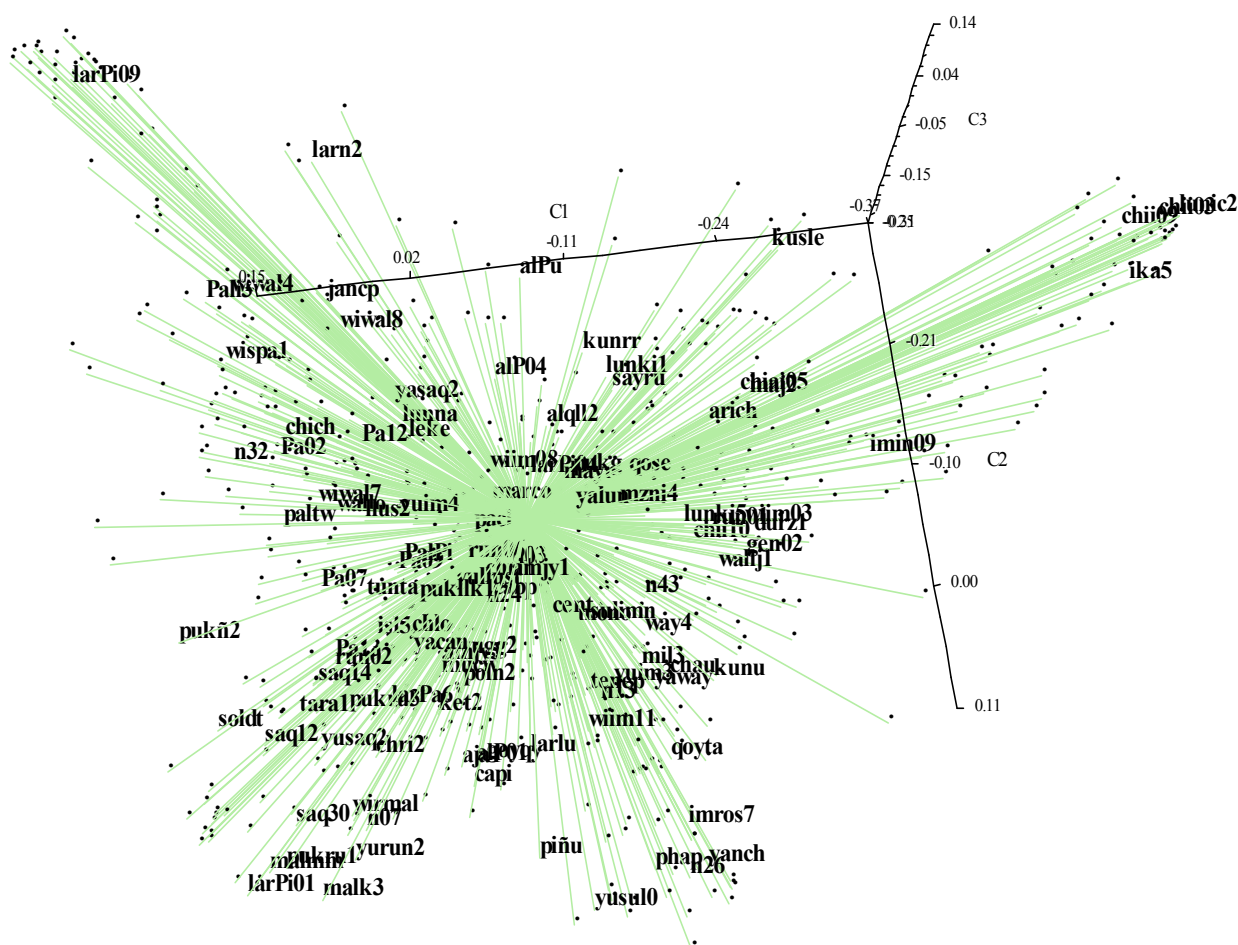


Figura 14. Distribución de las 114 accesiones de la colección núcleo.

En las Figuras 13 y 14, se observa que la colección núcleo obtenida, se distribuye entre toda la colección de manera amplia, explicando su representatividad.

La presente colección núcleo de 114 accesiones, representa un 16 % de las accesiones de la colección original. Huamán *et al.* (2000), también reportan la selección de una colección núcleo de la subespecie *andigena*, de accesiones provenientes de Bolivia. Indican que se

obtuvo una colección núcleo, que representó en un 17 % a un grupo de accesiones bolivianas de la subespecie *andigena*. En dicho trabajo, la caracterización se basó en un análisis con isoenzimas, en el banco de germoplasma conservado en el Centro Internacional de la Papa.

Este porcentaje de accesiones elegidas, señala la alta diversidad de la subespecie *andigena* en las accesiones bolivianas. También se confirma la importancia de conocer la diversidad de la subespecie *andigena*, conservada en el germoplasma de Bolivia. Esta diversidad debe promoverse y utilizarse en los programas y estrategias de mejoramiento genético

Esta alta diversidad también se verifica, al haberse encontrado un grupo reducido de probables duplicados. Se han encontrado 4 grupos con una similitud mayor a 0,98 dentro de cada grupo en la colección original de 688 accesiones. Cada grupo tiene entre 2 a 4 accesiones, siendo en total 12 accesiones. Sin embargo se debe constatar la duplicación, con la caracterización morfológica en campo, y de pasaporte. En Tabla 11 se ve la lista de las accesiones identificadas como probables duplicados.

Tabla 11. Lista de accesiones con probable duplicidad

| Accesiones | Departamento | Provincia | Nombre local | Grupo de similitud |
|------------|--------------|-----------------------|---------------|--------------------|
| 1 | Oruro | ^ | IMILLA NEGRA | 1 |
| 2 | Cochabamba | Tapacarí | IMILLA NEGRA | 1 |
| 3 | Potosí | Rafael Bustillo | YANA IMILLA | 1 |
| 4 | La Paz | Aroma | LUNKA ICARI | 2 |
| 5 | La Paz | Aroma | CHIYAR IMILLA | 2 |
| 6 | La Paz | Aroma | LUNKA | 2 |
| 7 | Cochabamba | Bolívar | LUNKU TAQUIÑA | 2 |
| 8 | La Paz | Pedro Domingo Murillo | CHIYAR IMILLA | 3 |
| 9 | Potosí | Tomás Frías | IMILLA ROSADA | 3 |
| 10 | La Paz | Ingavi | WILA YAKU | 3 |
| 11 | Potosí | Tomás Frías | YANA QOYLLU | 4 |
| 12 | Cochabamba | Chapare | CATAHUI NEGRO | 4 |

La información genética proveniente de las caracterizaciones morfológica y molecular, señala la alta diversidad de la subespecie *andigena* en esta colección. Las evaluaciones agronómicas contienen la información de la riqueza genética de la colección, sin embargo

tienen diferente grado de influencia de los factores ambientales, como es el caso de la respuesta a heladas.

Por lo tanto, en la formación de la colección núcleo, la caracterización molecular es la base inicial para formar la colección núcleo. Luego, la caracterización morfológica será complementaria para esta selección, porque contiene información genética complementaria a la información genética proporcionada por los 20 microsatélites.

La colección núcleo, debe complementarse con accesiones adicionales que sean de interés para fines como el mejoramiento y su utilización por el agricultor. Además, existen diferentes necesidades en condiciones del agricultor que enriquecerán la colección núcleo.

Posteriormente, la colección núcleo necesitará ser validada, mediante evaluaciones agronómicas y moleculares. Por ejemplo, pueden utilizarse marcadores moleculares asociados a caracteres de interés. La validación permitirá realizar ajustes, o modificaciones parciales, ya sea al tamaño o la composición de la colección núcleo. Esto hará que la colección en conjunto sea más dinámica y mejor conservada.

Por otra parte, en base a las caracterizaciones molecular y morfológica, y con la información de diferentes evaluaciones agronómicas, es posible plantear la construcción de colecciones temáticas. Esta selección se realizaría seleccionando aquellas accesiones representativas para un carácter o conjunto de caracteres de interés, teniendo la información correspondiente de las accesiones. Algunos usos posibles de una colección núcleo son descritas para facilitar el manejo y utilización del germoplasma conservado, en el Anexo 3 (van Hintum *et al.*, 2005).

La selección realizada para conformar la presente colección núcleo, incluyendo a las técnicas y criterios utilizados, podrá servir de base para fortalecer la gestión y utilización de los recursos genéticos de este cultivo. Es importante considerar que a medida que se vaya complementando las evaluaciones agronómicas y caracterizaciones al germoplasma, la dinámica de la presente colección será fortalecida.

5. CONCLUSIONES

- Se ha complementado la caracterización molecular de 688 accesiones de la subespecie *andigena* de papa, mediante 20 marcadores microsatélite.
- Existe una alta diversidad genética de la subespecie *andigena* en las accesiones bolivianas. El análisis mediante 20 microsatélites confirmó esta diversidad. Las accesiones mantienen su identidad genética y se muestra una tendencia a formarse grupos de similitud. Sólo se ha encontrado 4 casos eventuales de probable duplicidad.
- Se ha construido una colección núcleo a partir de 688 cultivares bolivianos de papa de la subespecie *andigena*, basándose en la caracterización molecular, complementada con la caracterización morfológica y evaluaciones agronómicas. Se obtuvo una colección núcleo de 114 accesiones (un 16 % del total) mediante la estrategia M, maximizando la diversidad retenida, utilizando las herramientas del programa PowerCore. Un 100% de los alelos y la diversidad de los caracteres morfológicos fueron retenidos en la colección núcleo obtenida.
- Existe correlación entre la estructura genética de las accesiones con varios caracteres morfológicos, principalmente del tubérculo. Ello posibilitará seleccionar grupos de accesiones para organizar la colección. Las evaluaciones agronómicas deben complementarse para el resto de las accesiones, para optimizar su conocimiento.

6. RECOMENDACIONES

- Es necesario caracterizar y evaluar de manera complementaria las accesiones no incluidas en este estudio, a fin de enriquecer la colección núcleo de la subespecie *andigena*.
- Por su importancia, como alimento prioritario en Bolivia y el mundo, se recomienda que la colección núcleo obtenida sea utilizada y validada por el I.N.I.A.F., para optimizar el manejo y conservación de germoplasma de papa.
- Se sugiere profundizar en el uso de las diferentes herramientas técnicas y de análisis de la diversidad genética de papa, para utilizarlas en la búsqueda y conocimiento de caracteres de interés.
- Se debe realizar colectas de papa cultivada, incluyendo a la subespecie *andigena*, para enriquecer la diversidad genética conservada. Esta y otras acciones deben ser parte de las estrategias nacionales de conservación *in situ* y *ex situ* de este cultivo.

7. BIBLIOGRAFÍA

Alandia S. (1994) Antecedentes y formación de colecciones de germoplasma de tubérculos andinos y quinua en Bolivia. En: Primera reunión internacional de recursos genéticos de papa, raíces y tubérculos andinos. 7-10 febrero. Cochabamba, Bolivia, pp 46-64

Bonierbale M, Amoros W, Espinoza J, Mihovilovich E, Roca W, Gómez R (2004) Recursos Genéticos de la papa: don del pasado, legado para el futuro. Suplemento Revista Latinoamericana de la Papa

Banco Nacional de Tubérculos y Raíces Andinas de Bolivia (2009) Base de datos.

Centro Internacional de la Papa (2008) Año Internacional de la Papa. CIP. http://www.cipotato.org/pressroom/spanish/facts_figures/2008_iyp.asp (Octubre 9, 2009)

Centro Internacional de la Papa (2010) Datos y cifras sobre la papa. CIP. Lima, Perú, 1 p

Contreras A (2005) Recursos genéticos de la papa en América Latina: distribución, conservación y uso. En: Simposio de Recursos Genéticos para América Latina y el Caribe. 23-25 Noviembre 2005. Montevideo, Uruguay. Volumen Especial, Agrociencia. (2005) 9: 93-103

Durán G, Cadima X, Zeballos J (2003) Desarrollo de una colección núcleo de la colección de papa cultivada (*Solanum* spp.) del banco de germoplasma de raíces y tubérculos andinos de Bolivia, U.M.S.S. – Fundación PROINPA, Cochabamba

Estrada N, Carrasco E, García W, Gabriel J. (1994) Utilización de varias especies silvestres y cultivadas para el mejoramiento genético de la papa. En: Primera reunión internacional de recursos genéticos de papa, raíces y tubérculos andinos. 7-10 febrero. Cochabamba, Bolivia, pp 65-75

Estrada N (2001) La biodiversidad en el mejoramiento genético de la papa. Centro de Información para el Desarrollo - C.I.D. - PROINPA - CIP. La Paz, Bolivia, 372 p

FAO (2005) Informe de aplicación del Plan de la acción mundial para la Conservación y utilización sostenible de recursos fitogenéticos y mecanismo nacional de intercambio de información sobre el Plan. Borrador. Proyecto Fortalecimiento de bancos de germoplasma. SINARGEAA, 117 p

FAO (2008) La papa y los recursos hídricos. FAO – División de Tierras y Aguas. <http://www.potato2008.org/es/lapapa/agua.html> (Mayo 5, 2011)

Frankel OH, Brown AHD (1984) Plant genetic resources today: a critical appraisal. In: Crop genetic resources: conservation and evaluation. Holden J.H.W. and Williams J.T. (eds.). George Allen and Unwin, London. pp. 249-257. Citado por: T Abadie (2001) Desarrollo de colecciones núcleo de recursos fitogenéticos. Documento estratégico PROCISUR. En: Estrategia en recursos fitogenéticos para los países del Cono Sur

Gouesnard B, Bataillon TM, Decoux G, Rozale C, Schoen DJ, David JL (2001) MSTRAT: An Algorithm for Building Germ Plasm Core Collections by Maximizing Allelic or Phenotypic Richness. The Journal of Heredity 2001:92(1).

Hawkes JG (1979) Evolution and polyploidy in potato species. En: Hawkes, J.G. (eds.). The biology and taxonomy of the *Solanaceae*. Linnean Soc Symp Ser. 7: 637-649

Hawkes JG (1988) The evolution of cultivated potatoes and their tuberbearing wild relatives. Kulturpflanze 36: 189-298

Hawkes JG (1990) The potato: evolution, biodiversity and genetic resources. Belhaven Press, Oxford, UK, 259 p

Hidalgo R (2003) Variabilidad Genética y Caracterización de Especies Vegetales En: Análisis estadístico de datos de caracterización morfológica de recursos fitogenéticos. Franco TL, Hidalgo R., Eds. IPGRI, Roma, Italia, Boletín Técnico N° 8 pp 2-26

Hijmans R J, Guarino L, Bussink C, Mathur P, Cruz, M, Barrantes I, Rojas E (2004) DIVA-GIS Versión 4. Sistema de Información Geográfica para el Análisis de Datos de Distribución de Especies. Manual. California, EEUU. Lizard Tech, Inc. – University of California, 91 p

Hijmans RJ, Spooner DM, Salas AR, Guarino L, De la Cruz J (2002) Atlas of Wild Potatoes. IPGRI, 143 p

Huamán Z (1986) Botánica y morfología de la papa. 2a ed., revisada. Centro Internacional de la Papa. Lima, Perú, 22 p

Huamán Z., Ortiz R., Zhang D, Rodríguez F (2000) Isozyme Analysis of entire and core collections of *Solanum tuberosum* subsp. *andigena* potato cultivars. Crop Sci. 40:273–276

Huamán Z, Spooner DM (2002) Reclassification of landrace populations of cultivated potatoes (*Solanum* sect. *Petota*) American Journal of Botany. 89: 947-965

Kyu -Won K, Chung KH , Cho GT, Ma KH, Chandrabalan D, Jae- Gyun G, Kim TS, Eun -Gi Ch, Yong- Jin P (2007) PowerCore: a program applying the advanced M strategy with a heuristic search for establishing core sets. Bioinformatics 2007 23(16):2155-2162

Linares G (2001) Escalamiento multidimensional: conceptos y enfoques. Revista Investigación Operacional 22(2):173-183

López JE, Oliveira JA (2007) Comparación de procedimientos para elaborar colecciones núcleo en accesiones de raigrás inglés e italiano del norte de España. Centro de Investigaciones Agrarias de Mabegondo (CIAM) - Departamento de Producción vegetal, Universidad de Santiago de Compostela España

Mayer M (2001) Variabilidad genética de la papa. En: Perspectivas tecnológicas en el uso de germoplasma de papas nativas. Ministerio de Agricultura del Perú, Instituto Nacional de Investigación Agraria (INIA), Centro Internacional de la Papa (CIP) pp 5-11

PASW (2009) Predicción de resultados e identificación de relaciones en los datos categóricos. PASW® Categories 18 – Especificaciones, 8 p

Perrier X, Flori A, Bonnot F (2003). Data analysis methods. In: Hamon P, Seguin M, Perrier X, Glaszmann JC Ed, Genetic diversity of cultivated tropical plants. Enfield, Science Publishers. Montpellier. pp 43-76

Perrier X, Jacquemoud-Collet JP (2006) DARwin software <http://darwin.cirad.fr/darwin>

Plan Nacional de Desarrollo de Bolivia (2009) Plan Nacional de Desarrollo de Bolivia 2006-2010. Estado Plurinacional de Bolivia.

Rea J (1991) Vigencia de las papas nativas en Bolivia. En: La papa amarga. Primera mesa redonda: Perú - Bolivia. 7-8 Mayo 1992. ORSTOM, La Paz, Bolivia, 111 p

Rea J (1994) Manejo *in situ* de germoplasma de tubérculos y raíces andinas en Bolivia. En: Primera reunión internacional de recursos genéticos de papa, raíces y tubérculos andinos. 7-10 febrero. Cochabamba, Bolivia, pp 81-96

Rodríguez LE (2009) Teorías sobre la clasificación taxonómica de las papas cultivadas (*Solanum* L. sect. *Petota* Dumort.). Una revisión. Agronomía Colombiana 27: 305-312

Rohlf F J (2008) NTSYSpc: Numerical Taxonomy System, Version 2.1. New York, EEUU. Exeter Publishing, Setauket.

Rojas JA, Cortez F, Veramendi S, Yamashiro J (2009) Colecciones del banco caracterizadas molecularmente. En: Manejo, Conservación y Uso Sostenible de los Recursos Genéticos de Tubérculos y Raíces Andinas en el marco del SINARGEAA. Informe Anual de Proyectos 2008-2009, Fundación PROINPA, Cochabamba

Schmiediche (1977) Biosystematic studies of the cultivated frost resistant potatoes specks. *S. Juzepczukii* Buk and *S. curtilobum* Juz et Buk. Ph. D. dissertation U. of Birmingham. England. Citado por: Tapia M (1991) Sistemas de producción de papa amarga En: La papa amarga. Primera mesa redonda: Perú - Bolivia. ORSTOM. 7-8 Mayo 1992. La Paz, Bolivia, 111 p

Spooner DM, Núñez J, Trujillo G, Herrera MR, Guzmán F, Ghislain M (2007) Extensive simple sequence repeat genotyping of potato landraces supports a major reevaluation of their gene pool structure and classification. PNAS 104(49), 19398-19403.

Sukhotu T, Kamijima O, Hosaka K (2005) Genetic diversity of the Andean tetraploid cultivated potato (*Solanum tuberosum* L. subsp. *andigena* Hawkes) evaluated by chloroplast and nuclear DNA markers. Genome 48: 55–64

Terrazas F, Guidi A, Cadima X, Gonzales R, Chávez E, Almanza J, Salazar M, Baudoin JP (2005) Conservación *in situ* y valoración de las papas nativas en el microcentro de diversidad genética de Candelaria, Cochabamba - Bolivia. En: Simposio de Recursos Genéticos para América Latina y el Caribe. 23-25 Noviembre 2005. Montevideo, Uruguay. Volumen Especial, Agrociencia 9: 135 – 146

Ugarte ML, Iriarte V (2003) Papas Bolivianas. Catálogo de cien variedades nativas. PROINPA-CIP-COSUDE. 113 p.

USDA, ARS, National Genetic Resources Program. (2011) Germplasm Resources Information Network - (GRIN) [Base de Datos en Línea]. National Germplasm Resources Laboratory, Beltsville, Maryland. URL: <http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/npgs/html/index.pl> (Junio 1, 2011)

Valadez K (2000) Huellas de ADN en genomas de plantas. Teoría y Protocolos de laboratorio. Ed. Mundi-Prensa. México, D.F. 147 p.

van Hintum ThJL, Brown AHD, Spillane C, Hodgkin T (2003) Colecciones núcleo de recursos fitogenéticos. Boletín Técnico No. 3 del IPGRI. Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos, Roma, Italia.

Balderrama F, Terceros F (2008) Diagnóstico y análisis de la situación de la papa en Bolivia. Cochabamba, Bolivia. Documento de trabajo, 70 p.

Zeballos J, Guzmán V, Cortez F (2009) Colecciones de tubérculos andinos caracterizadas y evaluadas. En: Manejo, Conservación y Uso Sostenible de los Recursos Genéticos de Tubérculos y Raíces Andinas en el marco del SINARGEAA. Informe Anual de Proyectos 2009, Fundación PROINPA.

ANEXOS

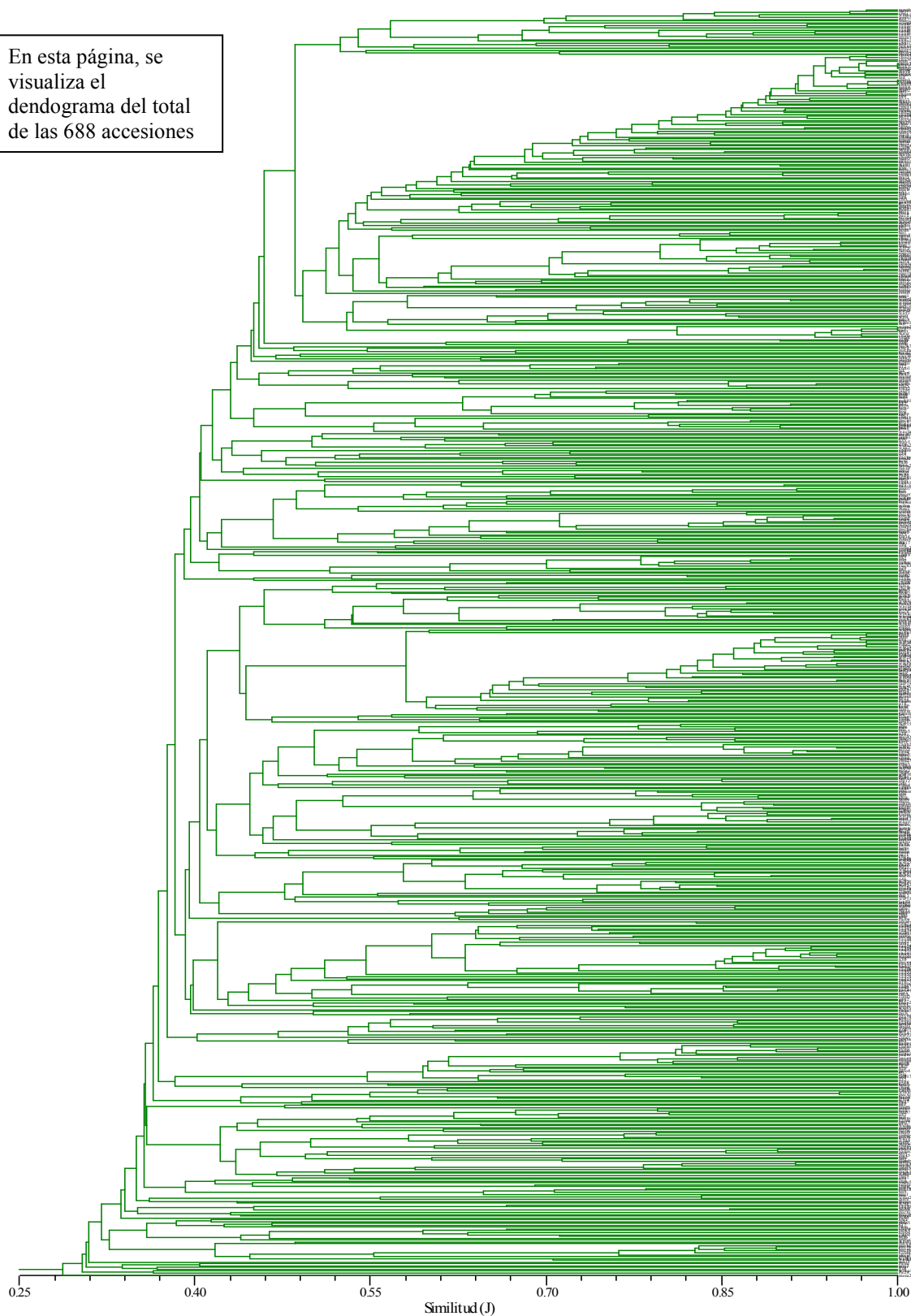
Anexo 1. Lista de iniciadores de los 20 microsatélites utilizados

| Nombre | Motivo de repetición | Secuencias de los iniciadores | | T° a |
|----------|-------------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|---------|
| STM5127 | (TCT)n | TTCAAgaATAggCAAAACCA | CTTTTTCTgACTgAgTTgCCTC | 55 (60) |
| STG0016 | (AGA)n | AgCTgCTCAgCATCAAgAgA | ACCACCTCAggCACTTCATC | 55 (53) |
| STM1064 | (TA)n (TG)n GT (TG)n | gTTCTTTTggTggTTTTCTT | TTATTCTCTgTTgTTgCTg | 55 (55) |
| STM5114 | (ACC)n | AATggCTCTCTCTgTATgCT | gCTgTCCCAACTATCTTTgA | 60 (57) |
| STM1053 | (TA)n (ATC)n | TCTCCCCATCTTAATgTTTC | CAACACAgCATAcAgATCATC | 53 (53) |
| STG0010 | (TG)n | CgATCTCTgCTTTgCAggTA | gTTCATCACTACCgCCgACT | 60 (55) |
| STI0001 | (AAT)n | CAgCAAAATCAgAACCCgAT | ggATCATCAAATTCACCgCT | 60 (55) |
| STI0012 | (ATT)n | gAAgCgACTTCCAAAATCAgA | AAAgggAggAATAgAAACCAAAA | 56 (55) |
| STI0032 | (GGA)n | TgggAAgAATCCTgAAATgg | TgCTCTACCAATTAACggCA | 61 (60) |
| STPoAc58 | (TA)n | TTgATgAAAaggAATgCAGCTTgTg | ACgTTAAAgAAgTgAgAgTACgAC | – (57) |
| STM0019 | (AT)n (GT)n (AT)n (GT)n (GC)n (GT)n | AATAggTgTACTgACTCTCAATg | TTgAAgTAAAAgTCCTAgTATgTg | – (47) |
| STI0004 | (AAG)n | GCTgCTAAACACTCAAgCAgAA | CAACTACAAGATTCCATCCACAg | 60 (55) |
| STI0033 | (AGG)n | TgAgggTTTTCAgAAAgggA | CATCCTTgCAACAACCTCCT | 61 (60) |
| STM1104 | (TCT)n | TgATTCTCTTgCCTACTgTAATCg | CAAAGTggTgTgAAgCTgTgA | 53 (57) |
| STM1052 | (AT)n GT (AT)n (GT)n | CAATTTCgTTTTTTCATgTgACA C | ATggCgTAATTTgATTTAATACgTA A | 50 (52) |
| STI0014 | (TGG)n (AGG)n | AgAAACTgAgTTgTgTTTgggA | TCAACAgTCTCAgAAAACCCTCT | 54 (55) |
| STG0025 | (AAAC)n | TggAATCCgAATTACgCTCT | AggTTTTACCACTCgggCTT | 56 (55) |
| STM1106 | (ATT)n | TCCAgCTgATTggTTAggTTg | ATgCgAATCTACTCgTCATgg | 51 (55) |
| STG0001 | (CT)n | CAgCCAACATTTgTACCCT | ACCCCACTTgCCATATTTT | 58 (52) |
| STM0037 | (TC)n (AC)n AA (AC)n (AT)n | AATTTAACTTAgAAgATTAgTC TC | ATTTggTTgggTATgATA | 52 (53) |
| STI0030 | (ATT)n | TTgACCCTCCAACATAgATTC TTC | TgACAACCTTAAAgCATATgTCAG C | 58 (60) |

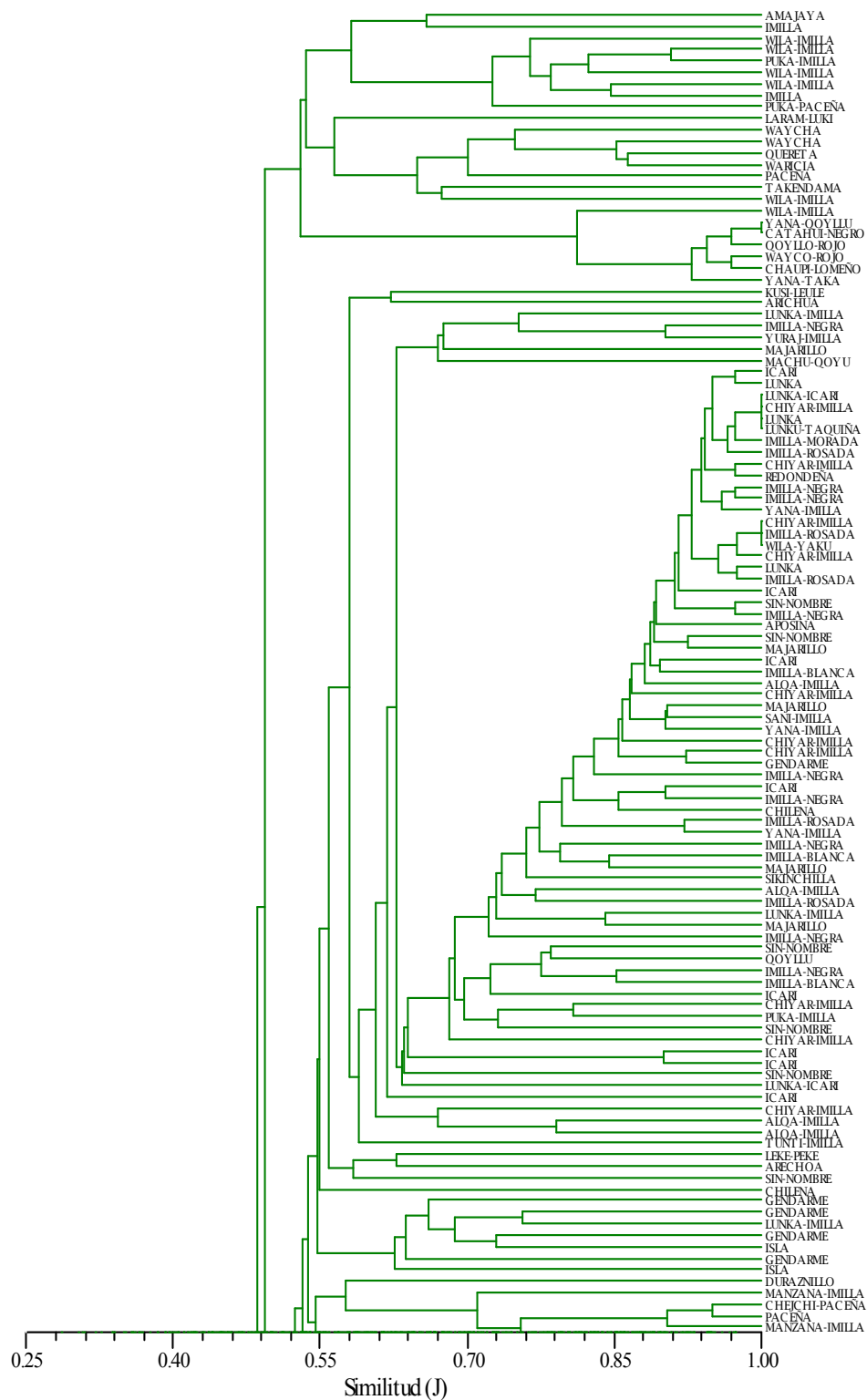
Fuente: Spooner *et al.* (2007)

Anexo 2. Dendograma de las 688 accesiones estudiadas. (por partes, en próximas páginas)

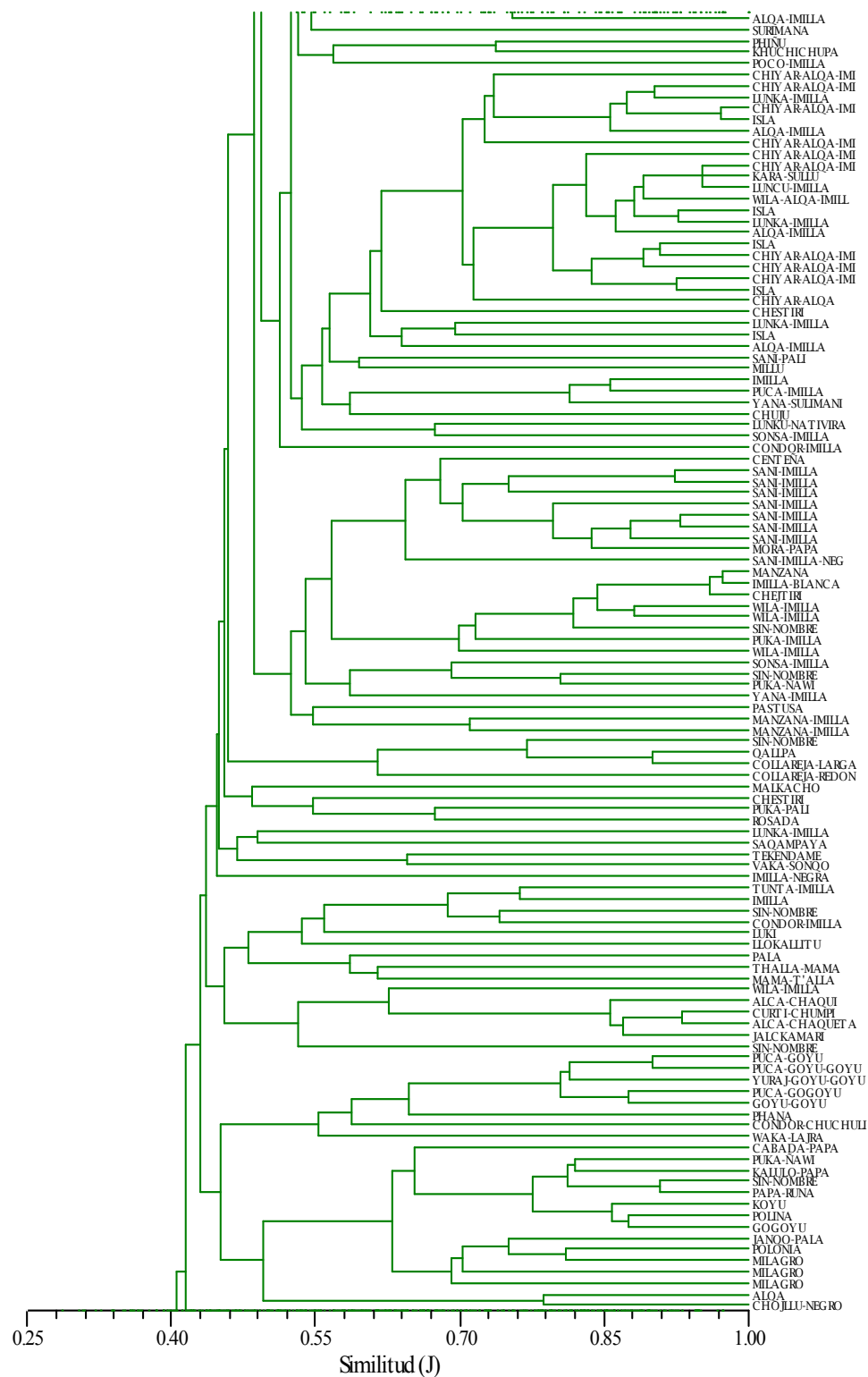
En esta página, se visualiza el dendograma del total de las 688 accesiones



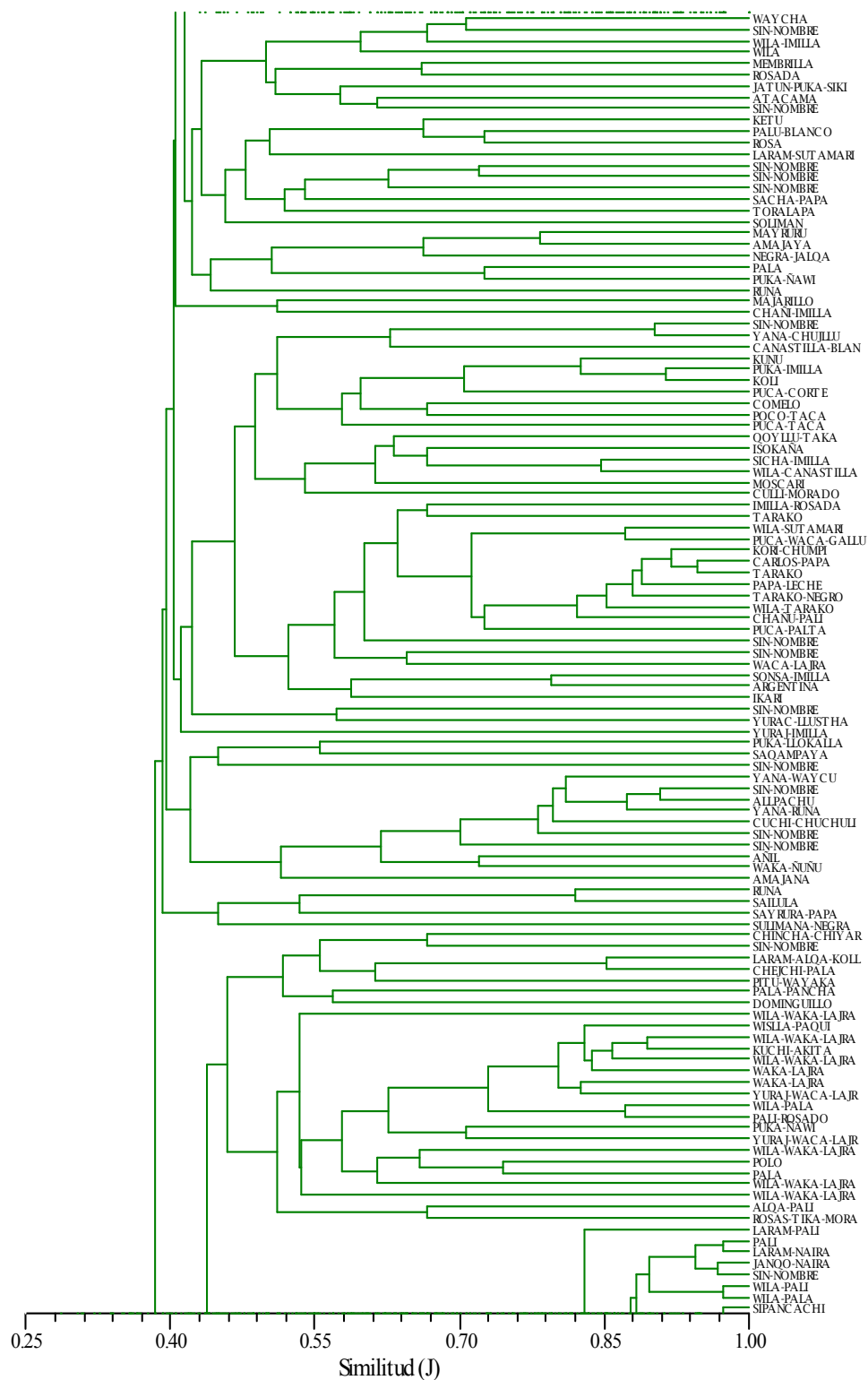
Anexo 2. Dendograma de las 688 accesiones estudiadas (Por partes, parte 1 de 6)



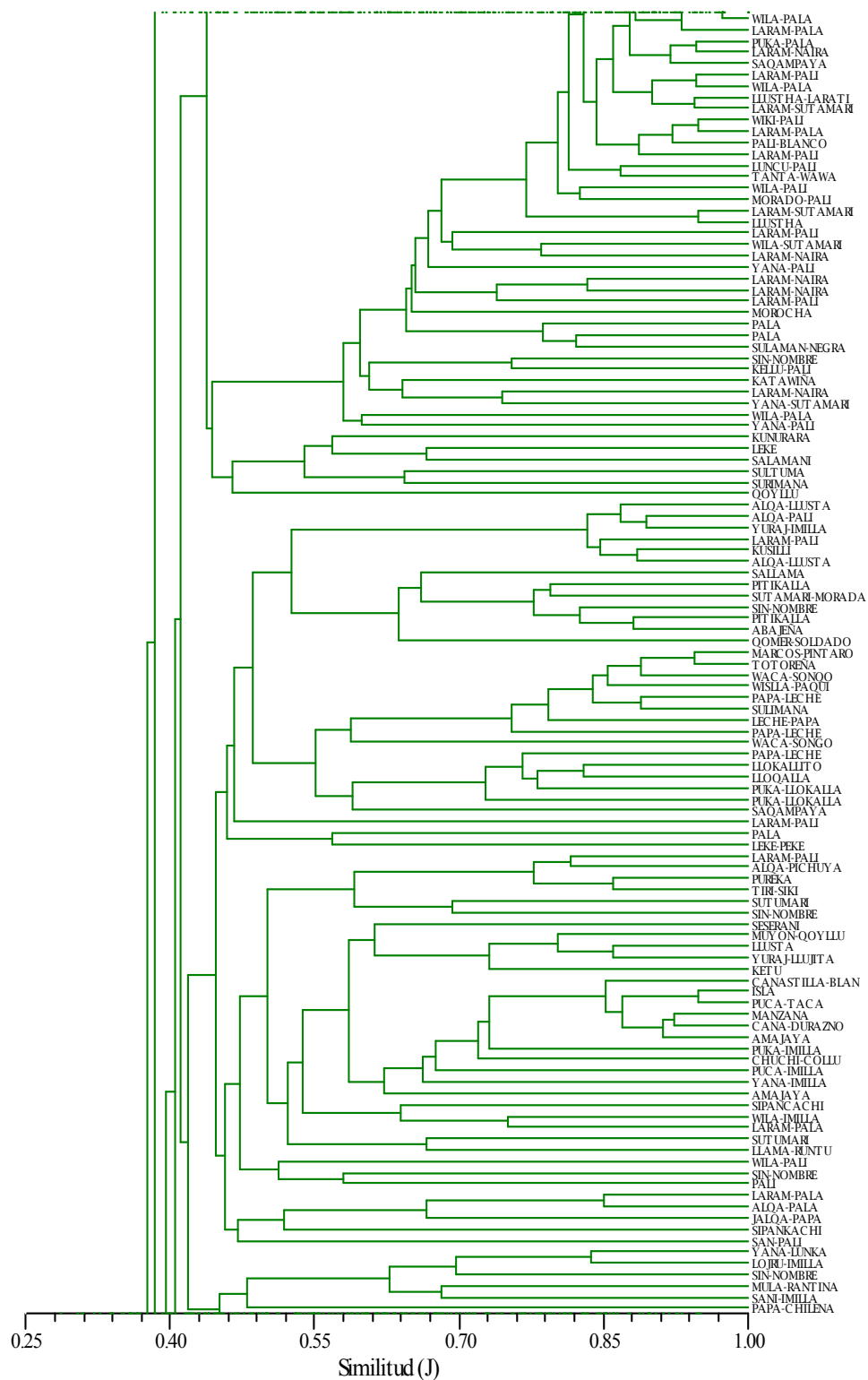
Anexo 2. Dendrograma de las 688 accesiones estudiadas (parte 2 de 6)



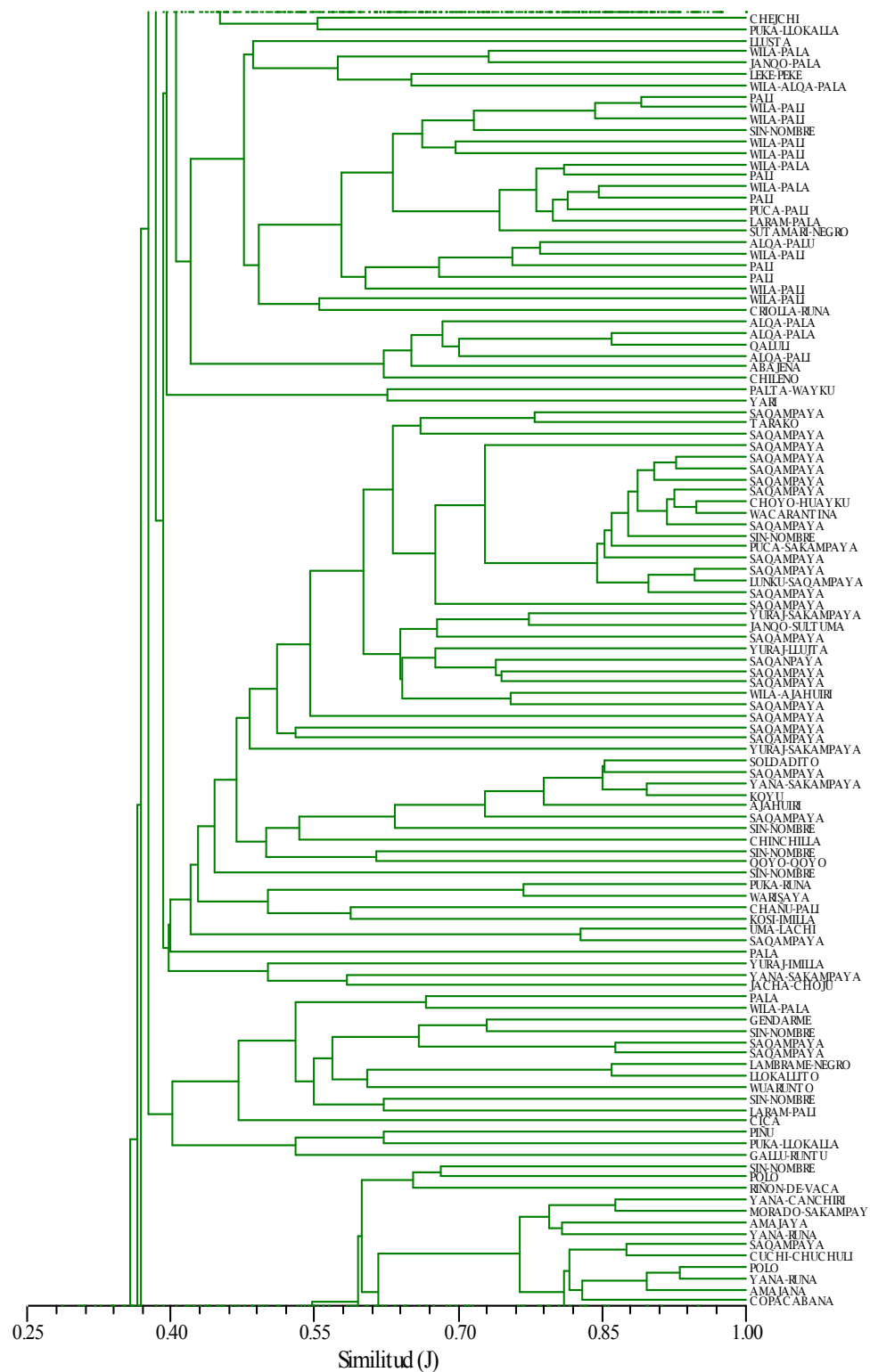
Anexo 2. Dendograma de las 688 accesiones estudiadas (parte 3 de 6)



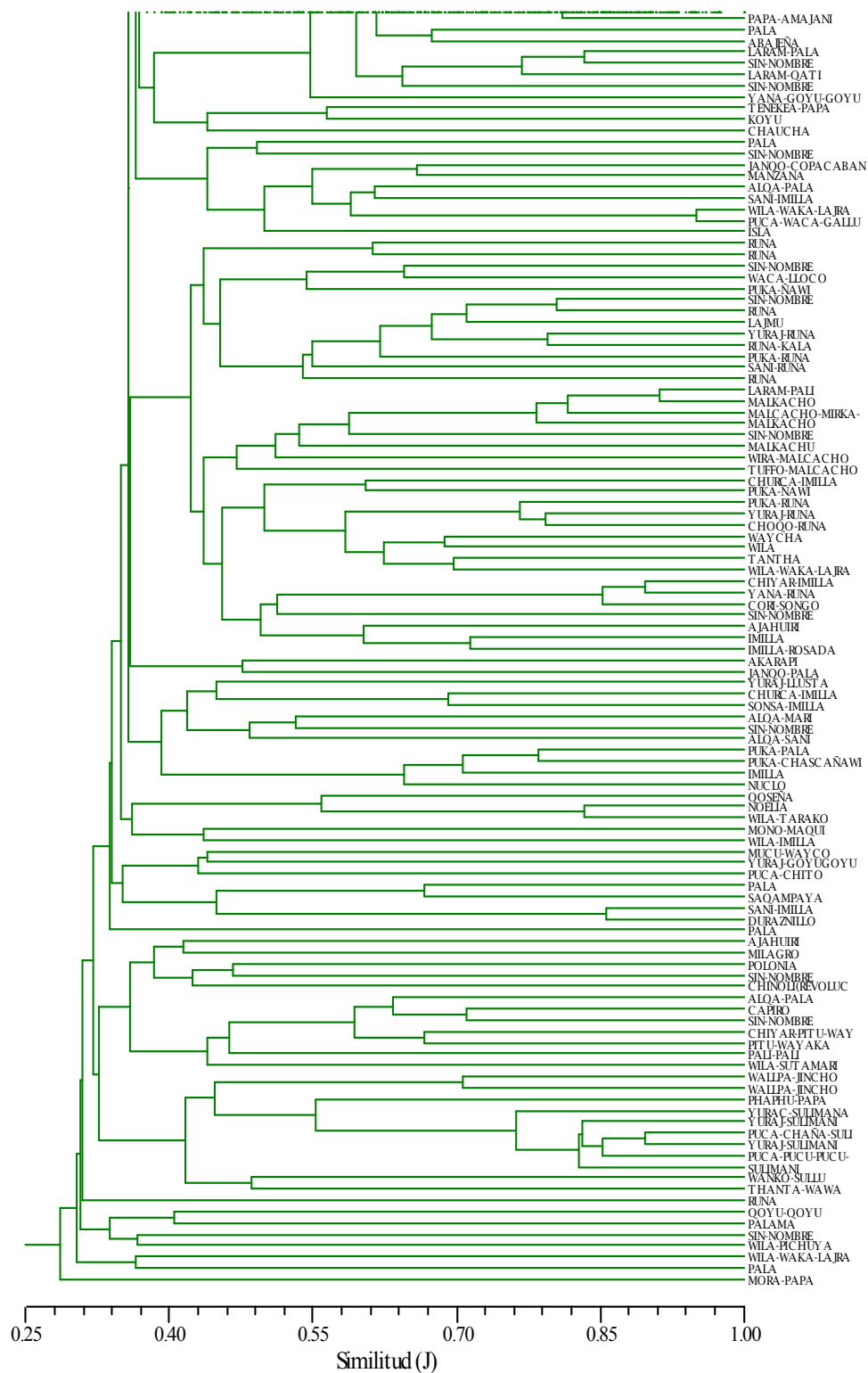
Anexo 2. Dendrograma de las 688 accesiones estudiadas (parte 4 de 6)



Anexo 2. Dendrograma de las 688 accesiones estudiadas (parte 5 de 6)



Anexo 2. Dendograma de las 688 accesiones estudiadas (parte 6 de 6)



Anexo 3. Ejemplos de formas de utilizar una colección núcleo (van Hintum *et al.*, 2005)

| Formas de uso de la colección núcleo | Actividades a realizar | Función de la colección núcleo |
|---|---|---|
| <p>COMO UN GRUPO PRIORITARIO</p> <p>COMO UN GRUPO DE REFERENCIA</p> <p>COMO UN GRUPO EXPERIMENTAL</p> <p>COMO UN GRUPO REDUCIDO</p> | <p>Características de la colección</p> <p>1. Definir dónde asignar nuevo material</p> <p>2. Detectar vacíos o fallas en la colecta</p> <p>Manejo de la colección</p> <p>3. Desarrollar cronogramas para la regeneración</p> <p>4. Asignar prioridades para el manejo</p> <p>5. Monitorear la viabilidad</p> <p>6. Duplicar por seguridad</p> <p>7. Desarrollar y aplicar nuevos métodos de conservación</p> <p>Manejo de la información</p> <p>8. Organizar bases de datos</p> <p>Estudio y uso de la colección</p> <p>9. Desarrollar listas de descriptores</p> <p>10. Probar caracteres costosos y complejos (como la respuesta al fotoperíodo)</p> <p>11. Desarrollar métodos</p> <p>12. Establecer relaciones entre diferentes caracteres</p> <p>13. Realizar estudios de genética</p> <p>14. Premejoramiento</p> <p>Distribución desde la colección</p> <p>15. Tener a mano un suministro adecuado de semilla</p> <p>16. Distribuir diversas muestras representativas</p> | <p>-Proveer un conjunto de referencia, para determinar el grupo de accesiones con las que se debe comparar el material nuevo</p> <p>-Permitir la identificación de lagunas o vacíos en la variación. que indican ausencias de material o conjuntos donde una gran cantidad de variación está asociada con unas pocas accesiones</p> <p>-Las accesiones de la colección núcleo tienen prioridad, especialmente cuando se está perfeccionando una colección</p> <p>-Proveer un conjunto para atender prioridades cuando sea necesario</p> <p>-Proveer un conjunto apropiado de accesiones para monitorear la colección completa</p> <p>-Actuar como un grupo prioritario para duplicación de seguridad, para distribuir a bancos de germoplasma regionales o internacionales, o para mantener en diferentes condiciones (p. ej., como genotecas de ADN, en campo, o <i>in vitro</i>)</p> <p>-Suministrar el material de prueba escogido para la posible llegada de procedimientos mejorados de mantenimiento (como semillas ultrasecas, técnicas <i>in vitro</i> y de criopreservación)</p> <p>-Suministrar puntos de referencia modelo para la documentación y permitir que se grabe la estratificación de la colección completa</p> <p>-Elegir accesiones apropiadas para probar la capacidad de los descriptores para discriminar accesiones</p> <p>-Permitir el desarrollo de un procedimiento eficiente de muestreo en dos pasos -primero entre un grupo y otro, y luego dentro de cada grupo</p> <p>-Proporcionar un conjunto de materiales que tenga probabilidad de abarcar una gama completa de expresión de características</p> <p>-Proporcionar un conjunto restringido con probabilidad de abarcar una gama completa de expresión de diferentes caracteres, para maximizar la eficiencia de los estudios de correlación</p> <p>-Permitir la selección de material óptimo para los estudios de herencia de caracteres y para el cálculo de la capacidad general de combinación</p> <p>-Suministrar grupos opuestos con probabilidad de contribuir a la identificación de la heterosis o de reunir entre todos nuevas combinaciones de genes</p> <p>-Pueden producirse mayores cantidades de semilla a partir del conjunto limitado de entradas de la colección núcleo</p> <p>-Proporcionar la máxima diversidad en conjuntos limitados de accesiones para realizar evaluaciones a las accesiones</p> |