

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA  
LA MOLINA**

**ESCUELA DE POSGRADO  
MAESTRÍA EN MEJORAMIENTO GENÉTICO DE  
PLANTAS**



**“ESTABILIDAD GENÉTICA DE GERMOPLASMA DE OLLUCO  
(*Ullucus tuberosus* Caldas) CONSERVADO EX SITU”**

**Presentada por:**

**JORGE ACURIO SAAVEDRA**

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE  
MAGISTER SCIENTIAE EN MEJORAMIENTO GENÉTICO DE  
PLANTAS**

**Lima - Perú**

**2015**

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA  
LA MOLINA**

**ESCUELA DE POSGRADO  
MAESTRÍA EN MEJORAMIENTO GENÉTICO DE  
PLANTAS**

**“ESTABILIDAD GENÉTICA DE GERMOPLASMA DE OLLUCO (*Ullucus  
tuberosus* Caldas) CONSERVADO EX SITU”**

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE  
MAGISTER SCIENTIAE**

**Presentada por:**

**JORGE ACURIO SAAVEDRA**

**Sustentada y aprobada ante el siguiente jurado:**

Dr. Jorge Jiménez Dávalos  
**PRESIDENTE**

Dr. Raúl Blas Sevillano  
**PATROCINADOR**

Dr. William Roca Pizzini  
**MIEMBRO**

Mg.Sc. María de Lourdes Tapia y Figueroa  
**MIEMBRO**

## **DEDICATORIA**

### **A Dios y a la Virgen María**

Porque bendicen y cuidan a toda mi familia

### **A mi madre Elena**

Por ser el mejor ejemplo a seguir, no solo como profesional sino ejemplo de vida.

### **A mis abuelos Octavio y Augusta**

Que desde el cielo encomiendan a Dios a toda mi familia.

### **Y en especial a mi esposa e hijos Jorge Andrei y Tatiana Milagros**

Porque son la razón de mi felicidad.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi esposa Carmela Milagros, por ser mi compañera de vida, mejor amiga y porque siempre está a mi lado alentándome. A mis hijos Jorge Andrei y Tatiana Milagros porque son la razón de mi felicidad y alegran mi vida cada día más.

A mis mamás Elena e Hilda, a mis papás Mario y Ángel, por brindarme su apoyo incondicional y confianza en todo momento y por darme el mejor ejemplo de perseverancia. A mis hermanos Dante, Richard, Elena y Augusta por formar siempre parte de mi vida. A mis abuelos Octavio y Augusta y a mi mamá Eva por haber sido un ejemplo de vida a seguir. A todos mis sobrinos por sus ocurrencias y travesuras que alegran la vida de toda mi familia. Y a Rosita por su atención constante.

A mi asesor el Dr. Raúl Blas por sus consejos y orientaciones, de igual manera, al Dr. Willian Roca por brindar grandes aportes para el beneficio del presente trabajo. Y a todos mis profesores y compañeros de la maestría de Mejoramiento Genético de plantas por compartir sus enseñanzas y experiencias como profesionales.

Mi gratitud al Dr. David Tay por permitirme participar dentro del equipo de trabajo del Banco de Germoplasma del Centro Internacional de la Papa y de manera especial al M. Sc. Iván Manrique por confiar en mí desde el primer momento y por su invaluable y continua ayuda hasta la culminación del presente trabajo. Al Ingeniero Francisco Vivanco y al Biólogo Roberto Gonzales, que participaron en este trabajo y en especial a mis amigos Carlos Ramírez por su desinteresada ayuda y a Alfredo Berrocal por su tiempo y constante disponibilidad durante la realización y redacción de la presente Tesis; así como a los técnicos y agricultores que de una u otra manera formaron parte de esta investigación y me ayudaron a concluir con este trabajo.

A todos mis compañeros y colegas del Laboratorio de ABL, Marcadores moleculares II y del Banco de germoplasma del CIP, en especial a: Julián Soto, Jorge Biondi, Ronald Robles, Giancarlo Espinoza y Rocío Alagón por su ayuda y recomendaciones puntuales.

A todos mis amigos del Laboratorio de ABL, Marcadores moleculares I y III del CIP, en especial a: Luis Gutiérrez, José Rodríguez, Juan Daniel Montenegro y Joel Flores por su ayuda, compañía y por alegrar aquellos días de intenso trabajo.

De la misma manera, agradezco al Convenio CIUF – UNSAAC, por hacer posible mi formación académica y científica en Post Grado; así mismo, el presente trabajo ha sido realizado gracias al apoyo financiero en base a los fondos concedidos por la Comunidad Interuniversitaria Francófona del País de Bélgica. Así también, a todos los profesionales que son parte del Convenio, en especial al Dr. Jean-Pierre Baudoin, por permitirme participar en calidad de beneficiario del Convenio y por haber contribuido positivamente en la consecución de mis estudios y a mis colegas M. Sc. Luz Marina Ponce y M. Sc. Américo Chacón por su desinteresado y continuo apoyo.

Espero no haberme olvidado de nadie y, por si fuera así, gracias a toda mi familia, a los compañeros de Maestría, parientes y amigos que han contribuido a que llegue este día feliz.

# ÍNDICE GENERAL

	<b>Pág.</b>
<b>RESUMEN</b>	
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>II. REVISIÓN DE LITERATURA</b>	4
2.1. El Cultivo de Olluco	4
2.2. Distribución Geográfica y Migración a otros Continentes	6
2.3. Número Cromosómico	6
2.4. Importancia del Cultivo de Olluco	7
2.5. Conservación de Recursos Fitogenéticos	8
2.6. Conservación <i>in vitro</i>	11
2.7. Estabilidad Genética	12
2.8. Variabilidad y Diversidad Genética	18
2.9. Métodos para el Análisis de Estabilidad Genética, Diversidad y Verificación de Identidad	19
2.9.1. Índices de similitud	19
a. Índice de similaridad Simple Matching	19
b. Índice de similaridad Jaccard	20
2.9.2. Análisis de Conglomerados	20
a. Método de Agrupamiento UPGMA	21
b. Clusters jerárquicos, secuenciales, aglomerativos y exclusivos (SAHN)	21
c. Método de Neighbor-Joining	21
2.9.3. Prueba de Remuestreo (Boopstrap)	22
2.9.4. Métodos Multivariados	22
a. Análisis de Coordenadas Principales (ACoP)	22
b. Test de Mantel	23
2.9.5. Índices de Diversidad Genética	23
a. Diversidad Genética de Nei (D)	23
2.9.5. Análisis de varianza molecular - AMOVA	24



**VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

51

**VIII. ANEXOS**

66

## ÍNDICE DE CUADROS

	<b>Pág.</b>
<b>Cuadro 1:</b> Combinaciones de iniciadores AFLPs (Eco+3/Mse+3) usados en la caracterización molecular del olluco	34
<b>Cuadro 2:</b> Agrupación de accesiones según índice de similitud SM (molecular) y distancia genética (morfológica)	35
<b>Cuadro 3:</b> Análisis de varianza molecular de las 151 accesiones distribuidas en regiones del norte, centro y sur	38
<b>Cuadro 4:</b> Caracteres asociados a los componentes principales (CP) de 151 accesiones de olluco y sus coeficientes de correlación. Valores absolutos resaltados con azul indican alto grado de discriminación del descriptor	41
<b>Cuadro 5:</b> Grupos duplicados de accesiones con índice de similitud y distancia taxonómica	43

## ÍNDICE DE FIGURAS

	<b>Pág.</b>
<b>Figura 1:</b> <b>A.</b> Características morfológicas del ulluco ( <i>Ullucus tuberosus</i> ) <b>B.</b> Formas de la lámina: 1. Ovada, 2. Cordada, 3. Deltoide, 4. semi-reniforme. <b>C.</b> Variación en la forma de los tubérculos de ulluco: 1. redondo, 2. cilíndrico, 3. semi-falcado, 4. Retorcido. <b>D.</b> Planta de ulluco en fase reproductiva. <b>E, F.</b> Flor de ulluco con pétalos, androceo y gineceo. Pétalos púrpura rojizo	5
<b>Figura 2:</b> Flujo de actividades realizadas para la caracterización morfológica en la evaluación de la estabilidad genética de germoplasma de ulluco conservado en el banco de germoplasma. <b>A.</b> Selección de material <i>in vitro</i> . <b>B, C.</b> Aclimatación. <b>D, E.</b> Preparación para la cosecha de tubérculos. <b>F.</b> Plantas en desarrollo en el campo experimental	27
<b>Figura 3:</b> Flujograma de la metodología para el análisis de la estabilidad genética de germoplasma de ulluco conservado en el banco de germoplasma del CIP	28
<b>Figura 4:</b> Esquema sobre las consideraciones para el establecimiento de estabilidad genética según marcadores moleculares y morfológicos	31
<b>Figura 5:</b> Representación del análisis de agrupamiento de accesiones, usando el índice de similitud SM mediante el uso de 142 marcadores AFLP	37
<b>Figura 6:</b> Dendograma formado con las 151 accesiones usando el índice de Jaccard. A 0.47 de índice de similaridad de Jaccard se forman los grupos I, II III	39
<b>Figura 7:</b> Análisis de coordenadas principales para la distribución genética de las accesiones según grupos geográficos	40
<b>Figura 8:</b> Fenograma de 151 accesiones de ulluco con 21 descriptores morfológicos, en el cual se identificaron 140 morfotipos	42

## ÍNDICE DE ANEXOS

	<b>Pág.</b>
<b>Anexo 1:</b> Plantas de Ulluco Silvestre	66
<b>Anexo 2:</b> Principales datos pasaporte de las accesiones de olluco utilizadas en este estudio	67
<b>Anexo 3:</b> Lista y detalles de los Protocolos de AFLP. El protocolo está basado en Vos <i>et al.</i> (1995) y optimizado para usar todos los reactivos en el CIP	74
<b>Anexo 4:</b> Lista de descriptores de olluco (IPGRI/CIP, 2003)	76
<b>Anexo 5:</b> Composición de sales de Murashigue y skoog para medios de cultivo <i>in vitro</i> de olluco	80
<b>Anexo 6:</b> Composición de medios de cultivo utilizados para micropropagación y conservación <i>in vitro</i> de olluco en el CIP	81

## RESUMEN

Los objetivos del presente trabajo fueron: 1) determinar la estabilidad genética de 236 accesiones de olluco (*Ullucus tuberosus* Caldas), del banco de germoplasma conservado en el Centro Internacional de la Papa (CIP) bajo condiciones *ex situ*, utilizando marcadores moleculares AFLP y descriptores morfológicos de olluco; 2) verificar la identidad de las accesiones, contrastando los resultados de estabilidad genotípica y fenotípica y 3) evaluar la variabilidad genética del olluco. Los análisis de agrupamiento, índice de diversidad genética, coordenadas principales y varianza molecular (AMOVA); determinaron la estabilidad genética de 151 accesiones que representó el 64 por ciento del total de accesiones estudiadas. El índice de correlación ( $r = -0.23198$ ) mostró una baja asociación entre las matrices de similitud morfológica y molecular. El Índice de Diversidad Genética Nei fue 0.35, que indica una alta diversidad genética para la colección evaluada. Los análisis de agrupamiento, análisis de coordenadas principales y AMOVA (índice de fijación,  $F_{st} = 0.11$ ) mostraron una diferenciación moderada entre las accesiones procedentes del norte, centro y sur del Perú, lo que significaría la existencia de variantes exclusivas por regiones. El Índice de Similitud de Jaccard asociado con la distancia genética morfológica establecieron la presencia de 147 accesiones únicas y cuatro accesiones duplicadas. En conclusión estos resultados contribuirán a la implementación de nuevas estrategias de conservación *ex situ* de germoplasma de olluco.

**Palabras claves:** *Ullucus tuberosus*, estabilidad genética, caracterización, descriptores morfológicos, AFLP, diversidad genética, AMOVA.

## ABSTRACT

The objectives of this study were: 1) Determining the genetic stability of 236 accessions of olluco (*Ullucus tuberosus* Caldas), stored under *ex situ* conditions at genebank of the International Potato Center (CIP), using molecular markers AFLP and morphological descriptors of olluco, 2) Verifying the identity of the accessions, contrasting the results of genotypic and phenotypic stability and 3) Evaluating the genetic diversity of olluco. Cluster analysis, genetic diversity index, principal coordinates and molecular variance (AMOVA); determined verification of the identity and genetic stability of 151 accessions which represented the 64 per cent of the accessions studied. The correlation index ( $r = -0.23198$ ) showed a weak association between morphological and molecular arrays similarity. The Genetic Diversity Index Nei was 0.35 that indicates a high genetic diversity for the collection evaluated. The cluster analysis, principal coordinates analysis and AMOVA (fixation index,  $F_{st} = 0.11$ ) showed moderate differentiation among accessions from northern, central and southern Peru, which would mean the existence of exclusive variations by regions. Jaccard Similarity Index associated with morphological genetic distance determined the presence of 147 unique accessions and four duplicate accessions. In conclusion these results will contribute to the implementation of new strategies for *ex situ* conservation of germplasm of olluco.

**Key words:** *Ullucus tuberosus*, genetic stability, characterization, morphological descriptors, AFLP, genetic diversity, AMOVA.

## I. INTRODUCCIÓN

La región andina es cuna de un gran número de cultivos alimenticios que fueron domesticados por pueblos autóctonos hace miles de años, mucho antes de la expansión de la civilización Inca. Con el transcurso del tiempo, algunos de estos cultivos han adquirido importancia global, como la papa; sin embargo, la mayoría son poco conocidos internacionalmente. En los últimos años los tubérculos altoandinos, han cobrado importancia en los países andinos; siendo el olluco después de la papa, el tubérculo más utilizado por los pobladores andinos, porque constituyen un componente de la base biológica de la seguridad alimentaria y forma parte de su cultura (PROINPA, 2003).

El Perú es parte del genocentro andino donde se han originado y domesticado la mayoría de variedades de olluco. En el CIP se mantiene una colección de recursos genéticos de olluco, bajo los auspicios de la FAO, CIID, IBPGR, GTZ y otras organizaciones internacionales. Estos recursos se mantienen como colecciones *ex situ* principalmente (en el campo, haciendo uso de las técnicas de cultivo de tejidos *in vitro* y bajo criopreservación) y conectado a componentes de conservación en el campo del agricultor.

La necesidad de estudiar los aspectos biológicos y logísticos del establecimiento y manejo de los bancos de germoplasma *in vitro*, fue reconocido a partir de 1980, por el comité de conservación *in vitro* del Consejo Internacional de Recursos Genéticos Vegetales (IBPGR). En este tiempo se reconoció la importancia del uso de estas técnicas para la conservación de germoplasma, principalmente de aquellos cultivos, que no pudieran almacenarse como semillas.

La conservación *in vitro* de germoplasma ha tenido éxito con la utilización de inhibidores de crecimiento de las plantas. Además, por requerir de espacio reducido y protección de los materiales contra variaciones climatológicas y edafológicas, y contra el ataque de plagas y enfermedades, que podrían afectar los materiales en el campo (Roca y Mroginski 1991; Calva y Ríos 1999; Peredo *et al.*, 2008). Sin embargo, a consecuencia de

la continua multiplicación clonal de las entradas en el banco *in vitro*, su mantenimiento prolongado en condiciones artificiales (Modgil *et al.*, 2005), podría poner en peligro la integridad genética de los clones (Rani y Raina 2000; Pontaroli y Camadro 2005). La producción de mutaciones (Xena *et al.*, 2000) o de variantes somaclonales, los cambios epigenéticos o modificaciones heredables reversibles en la función de los genes que surgen durante el desarrollo y la proliferación celular y la ocurrencia de mezclas de material por errores en su identificación; son riesgos a tener en cuenta para monitorear, prevenir o minimizar en los bancos *in vitro*.

La estabilidad genética de los materiales que se mantienen por periodos largos de tiempo merece estudio y monitoreo, siendo necesario establecer los procedimientos para maximizar la seguridad de la estabilidad genética de los materiales en el banco *in vitro*.

Es necesario también determinar la influencia de los componentes del medio de cultivo como las hormonas, los inhibidores de crecimiento o los agentes osmóticos utilizados en los medios de micropropagación y conservación *in vitro*.

Algunos cambios genéticos son fácilmente detectados (Miller, 1935; Rosa, 1926), sin embargo, en condiciones *in vitro*, existe la posibilidad de cambios que pueden provocar variación somaclonal, o alguna mutación puntual. Estos cambios son estudiados y monitoreados con el uso de descriptores morfológicos, bioquímicos y en los últimos años, el desarrollo de técnicas de genética molecular hace posible integrar al análisis de la estabilidad genética el uso de marcadores genéticos a nivel del ADN. Es por ello, que el presente trabajo de investigación estuvo encaminado a contribuir al conocimiento de la diversidad genética, verificar la identidad genética, comprobar los genotipos duplicados y determinar la estabilidad genética de las plantas de olluco recuperadas luego de su conservación *in vitro* usando una colección representativa, mantenida en el banco de germoplasma del CIP, aplicando diversas técnicas de caracterización y proponer el establecimiento de protocolos de monitoreo sobre la estabilidad genética del germoplasma.

## **1.1 Hipótesis:**

Los Bancos de Germoplasma *in vitro* y en campo preservan las características fenotípicas y genotípicas del material en conservación.

## **1.2 Objetivos**

### **1.2.1 Objetivo general**

- Determinar la estabilidad genética de una colección representativa de accesiones del banco de germoplasma de olluco conservado en el Centro Internacional de la Papa bajo condiciones *ex situ*.

### **1.2.2 Objetivos específicos**

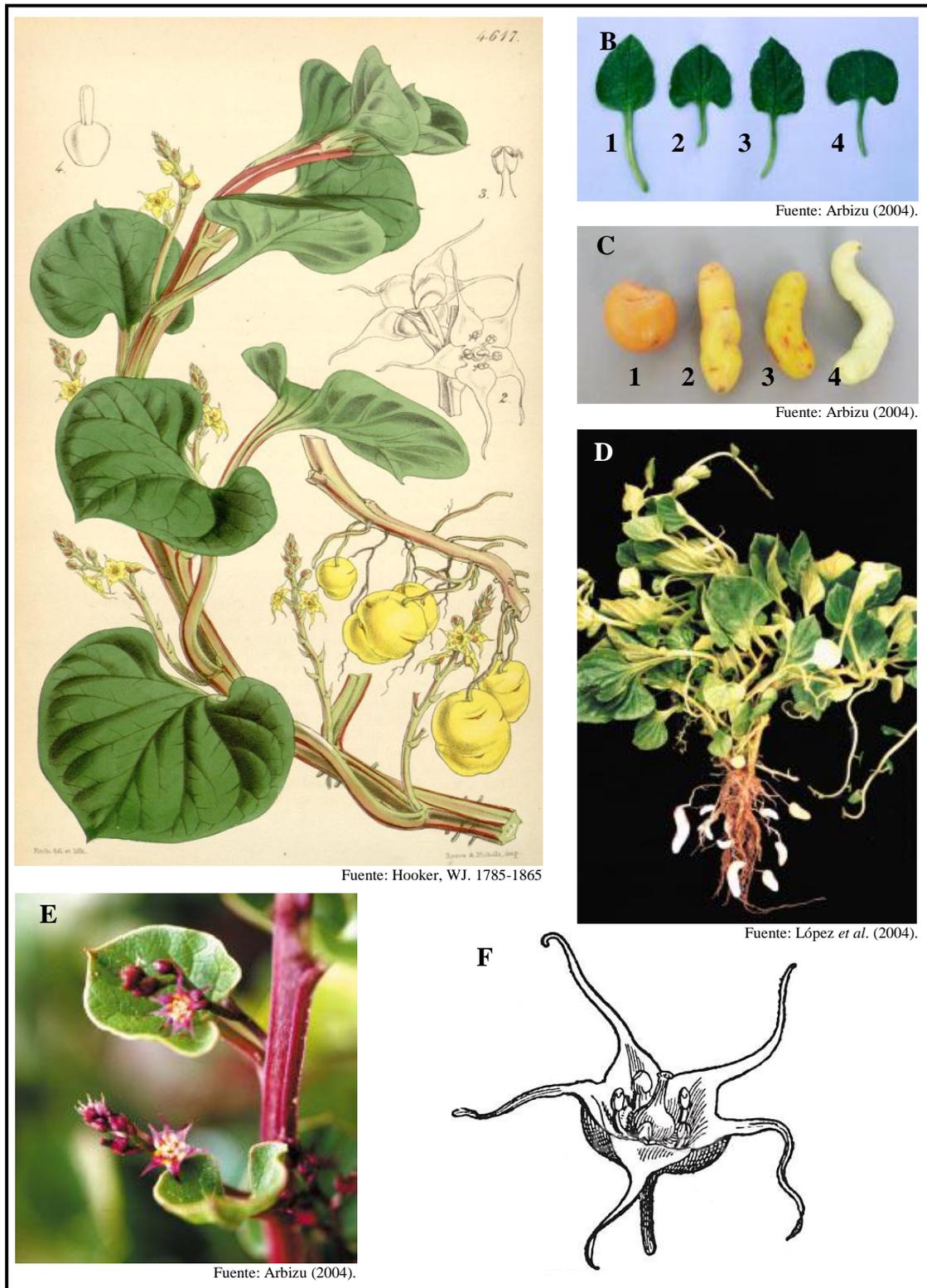
- Evaluar la variación fenotípica, mediante el uso de descriptores morfológicos, y la variación molecular usando AFLP, de accesiones de olluco conservado *ex situ*.
- Estimar la relación entre el tiempo de conservación *in vitro* y la estabilidad genética.
- Verificar la identidad genética en base a los resultados de estabilidad fenotípica y molecular.
- Evaluar la diversidad genética y morfológica de las accesiones de olluco con estabilidad fenotípica y genotípica.
- Determinación de accesiones de olluco duplicados según descriptores morfológicos y moleculares.

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1 El cultivo de olluco

El Olluco (*Ullucus tuberosus* Caldas), pertenece a la familia Basellaceae y consta de 04 géneros diferenciados morfológicamente (Robles, 1981); también se le conoce como *Ullucus tuberosus* Loz, *Ullucus kunthii* Moq, *Basella tuberosa* HBK, *Melloca tuberosa* Lindl, *Melloca peruviana* Lindl (Nacional Research Council, 1989); citado por Delgado (1999) y *Basella tuberosa* Kunth, *Melloca peruviana* Moq, *Ullucus tuberosus* Moq (Missouri Botanical Garden, 2008). El género *Ullucus* comprende una sola especie, el *Ullucus tuberosus* Caldas, y de acuerdo a Sperling (1987), tiene dos subespecies: *Ullucus tuberosus* subsp. *aborigineus*, dentro de la cual están incluidos todos los olluocos silvestres (ANEXO 1) y *Ullucus tuberosus* subsp. *tuberosus* (Figura 1); siendo esta, domesticada, cultivada y comestible.

El olluco es una planta herbácea anual, que alcanza 20 a 50 cm de altura, está formada por 3 a 6 tallos erectos y carnosos, a veces rastreros o semirastreros, las hojas son gruesas y acorazonadas, succulentas y mucilaginosas, alternas de peciolo largo y de color verde oscuro en el haz, más claro en el envés y al final de su ciclo queda postrada (Hernández y León, 1992; Tapia *et al.*, 1996). Las flores son pequeñas, perfectas e incompletas de color amarillento, tienen forma de estrella, con un perigonio de cinco sépalos (Figura 1), muy rara vez forma frutos; la semilla tiene forma de pirámide invertida, con ángulo muy prominente y superficie corrugada. Existe una gran variación en forma y tamaño, de los tubérculos (Figura 1), los hay pequeños, alargados hasta redondos del tamaño de una papa, el color muestra una amplia variación, con 12 estados que van desde el blanco hasta el rojo (IPGRI / CIP, 2003). Además de los colores predominantes, también es común encontrar un color secundario del tubérculo; los ojos son muy superficiales y sin brácteas (Cárdenas, 1989; Tapia, 1993). La forma y tamaño de los tubérculos puede ser influenciado por el tipo de suelo, localidad y variedad, entre otros factores (Grau y Rea, 1997).



**Figura 1: A. Características morfológicas del olluco (*Ullucus tuberosus*) B. Formas de la lámina: 1. Ovada, 2. Cordada, 3. Deltoide, 4. semi-reniforme. C. Variación en la forma de los tubérculos de olluco: 1. redondo, 2. cilíndrico, 3. semi-falcado, 4. Retorcido. D. Planta de olluco en fase reproductiva. E, F. Flor de olluco con pétalos, androceo y gineceo. Pétalos púrpura rojizo.**

## 2.2 Distribución geográfica y migración a otros continentes

El olluco crece en los Andes de Sudamérica, desde los 9 °N en Venezuela hasta los 23 °S en Jujuy, Argentina, extendiéndose incluso hasta Chile (León, 1964; Brücher, 1967; King, 1988); en un rango altitudinal que alcanza los 4,000 m (Tapia y Arbizu, 1991); sin embargo la mayor producción se obtiene entre los 3,600 y 3,800 m en lugares algo protegidos de las bajas temperaturas. En el Perú se cultiva en 18 de los 24 departamentos, los lugares de producción que más destacan son: Cusco, Cajamarca, Ayacucho, Puno, Apurímac, y Junín, (SIEA, 2012).

El lugar de origen del olluco, aún no está definido. Herrera, citado por León (1994) indica que se han observado plantas consideradas como silvestres en Perú (departamento del Cusco) y Bolivia. También cita a Bukasov quien cree que los tipos colombianos son los más primitivos. Por otro lado, King (1986) indica que el olluco está entre las plantas domesticadas en los Andes, alrededor de 5,500 A.C. De acuerdo a estas consideraciones, se puede afirmar que sería la Zona Andina el lugar de origen y domesticación del olluco (Vimos *et al.*, 1997).

En 1948 el olluco migró a Europa, después de la escasez de papa, como cultivo alternativo potencial (King, 1988); pero de acuerdo a Rousi *et al.* (1989), se perdió el interés en el cultivo por sus bajos rendimientos. Hasta la fecha, ninguna variedad de olluco ha sido introducida en América del Norte, para la producción de tubérculos en condiciones naturales de campo. Actualmente, se cultiva en todos los países andinos, desde Argentina hasta Venezuela, y en muchos países como Finlandia, Francia y Nueva Zelanda (Avalos, 2008).

## 2.3 Número cromosómico

El número básico de cromosomas en el olluco es  $x=12$  (Darlington y Wylie, 1955; Gandarillas y Luizaga, 1967; Lescano, 1985; Rousi *et al.*, 1989; Larkka, 1991; Larkka *et al.*, 1992). Según Larkka (1992) y Méndez (1995), los ollucos silvestres (*Ullucus tuberosus* subsp. *aborigineus*) son triploides ( $2n=3x=36$ ); mientras que en los cultivados (*Ullucus tuberosus* subsp. *tuberosus*), alrededor de 96 % de los cultivares son diploides ( $2n=2x=24$ ), 3 % triploides ( $2n=3x=36$ ) y 1 % tetraploides ( $2n=4x=48$ ). El olluco como cultivo clonal

puede exhibir una considerable diversidad en el número cromosómico. Además otro aspecto a ser considerado son las alteraciones en el curso del ciclo celular, particularmente ciclos incompletos, con una notable incidencia de ciclos irregulares que podrían condicionar en esta especie la diversidad de reportes para el número cromosómico y constituir uno de sus probables mecanismos de poliploidización (Talledo y Escobar, 1996). Aunque el olluco, con muy poca frecuencia, produce semilla en los Andes, la existencia de los niveles de ploidía indicados sugieren que en el pasado la planta tuvo reproducción sexual. Fuerzas de selección bióticas y abióticas de los Andes, unidas a factores culturales y selección estética practicada por el agricultor andino a través de miles de años sobre plantas del género *Ullucus*, han dado como resultado una gran variación morfológica y reacciones diversas a plagas y enfermedades del conjunto de olluco cultivados (Arbizu, 2004).

## **2.4 Importancia del cultivo de olluco**

En la zona altoandina se originaron plantas, que luego de un largo y complejo proceso de domesticación y dispersión, sirvieron como fuente alimentaria a los antiguos pobladores de estas zonas y que actualmente constituyen la fuente de alimentación del poblador rural andino (Valladolid *et al.*, 1982). El olluco es un cultivo de gran importancia social y económica de la región altoandina (King, 1988), por lo que, es el cultivo tuberífero que más se produce y consume después de la papa en todo los países andinos (León, 1964; Cárdenas, 1969; Pietila y Tapia, 1991).

Por su rusticidad, el olluco se adapta a condiciones de fríos extremos y sequías, propios de las altas montañas (Acosta-Solis, 1980; Pietila, 1988), produce altos rendimientos en suelos marginales (Salís, 1986; National Research Council, 1989). En el Perú se cultiva anualmente alrededor de 26,000 ha de olluco con un rendimiento promedio de 6 a 7 t<sub>xa</sub><sup>-1</sup> en condiciones tradicionales (SIEA, 2012).

El olluco, junto con los demás tubérculos andinos constituye fuente de calorías y proteínas para cerca de 9 millones de personas que viven entre 2500 a 4000 m (Tapia, 1982). Según Hermann y Heller (1997) el olluco tiene 30 millones de consumidores en el área andina. Presenta una variedad de usos culinarios, siendo consumido tanto en fresco (hervidos) como deshidratado (lingli, shilgui), en sopas y harinas (León, 1964; Rea, 1977;

National Research Council, 1989). Las hojas pueden consumirse como espinaca (Bukasov, 1985). Las hojas son ocasionalmente consumidas en Perú y Colombia en forma de ensaladas (National Research Council, 1989).

El examen bromatológico en base al peso seco para el olluco revela un alto contenido de carbohidratos que fluctúa entre 73.5 y 84.2%, con presencia de un buen contenido de azúcares libres digestibles como fructosa, glucosa y sucrosa, y un 69.8% de almidón (King y Gershoff, 1987; King, 1988; Gross *et al.*, 1989; Repo y Kameko, 2004.); las hojas por otro lado pueden contener hasta 12% de proteína en peso seco (National Research Council, 1989), incluidos seis de los ocho aminoácidos esenciales en la dieta humana (Lescano, 1994; Barrera *et al.*, 2004). Finalmente, los tubérculos del olluco presentan gran cantidad de vitamina C (hasta 26 mg/ 100 gr de peso fresco) (Brücher, 1989; National Research Council, 1989; Espin *et al.*, 2004), complementándose con minerales como fósforo, calcio y hierro (Cortés, 1985).

## **2.5 Conservación de recursos fitogenéticos**

La conservación de los recursos fitogenéticos ha adquirido relevancia en las últimas décadas, no sólo por la erosión que conlleva a la pérdida o disminución de la diversidad genética, sino también por el valor potencial que poseen estos recursos y su producción sostenible. En los últimos años los tubérculos altoandinos: oca, olluco y mashua, han cobrado importancia en los países de Bolivia, Perú, Ecuador y Colombia, porque constituyen la base biológica de la seguridad alimentaria del poblador andino de estos países, por su gran variabilidad genética, potencial de cultivo y como alternativas de rotación. Sin embargo, en las últimas décadas estos cultivos corren el riesgo de sufrir erosión genética, por muchos factores como: los cambios en los hábitos de consumo de la población rural y urbana, sustitución de variedades nativas tradicionales por variedades nativas comerciales debido a la influencia del mercado, falta de promoción para su utilización en otros rubros como la industria, entre otros.

La protección de la diversidad genética de cualquier especie es un mandato mundial, por ello muchas instituciones en todos los países están contribuyendo con ese objetivo. En el caso de las raíces y tubérculos, los países altoandinos (Perú, Ecuador y Bolivia) han unido esfuerzos a través del Programa Colaborativo de Biodiversidad de

Raíces y Tubérculos Andinos (PBRTA) para rescatar estos recursos genéticos, conservarlos, evaluarlos y determinar sus usos.

La conservación de la mayoría de las plantas cultivadas puede ocurrir *in situ* (en su hábitat natural) o *ex situ* (fuera de su hábitat natural) (UNCED, 1992).

Los métodos de conservación *in situ* presentan altos costos, requieren un considerable espacio y es de difícil aplicación debido a que las especies pueden perderse por factores bióticos y abióticos. Se clasifican en: parques nacionales y reservas naturales. Por otro lado, los métodos de conservación *ex situ*, también presentan altos costos; sin embargo, tienen la ventaja de ofrecer un control directo sobre el material a conservar, pero presentan la desventaja del cese de la selección natural y la posible pérdida de variabilidad genética durante la recolección y /o multiplicación. Éstos se clasifican en: bancos de semillas, colecciones de campo, bancos de cultivo *in vitro* y bajo crioconservación.

La conservación en bancos de semillas es la forma indicada para la mayoría de las especies cuyas semillas resisten la desecación y pueden ser almacenadas a bajas temperaturas sin alterar su viabilidad. Las semillas que presentan estas características se denominan ortodoxas (Engelmann, 1997); en ciertos casos esta metodología no es conveniente, ya sea porque la especie no produce semillas o presentan semillas recalcitrantes (Engelmann, 1997, 2002). Es uno de los métodos más generalizados y eficaces ya que posibilitan el almacenamiento de una gran variabilidad genética de modo práctico y económico además de ser una forma conveniente para la distribución e intercambio de germoplasma. En numerosos cultivos de importancia económica la conservación por medio de semillas no es apropiada debido a problemas de infertilidad, poca viabilidad, alta segregación genética, polinización cruzada, alta heterocigosis o propagación vegetativa. En este caso las colecciones de campo son adecuadas; no obstante, los problemas asociados a este tipo de colecciones se basan fundamentalmente en que no sólo se requiere espacio y tiempo para su mantenimiento sino que están expuestas a todo tipo de desastres naturales pudiendo ocasionar pérdidas de material. Además, la distribución e intercambio de germoplasma en esta forma es difícil debido a la naturaleza vegetativa del material y al riesgo que implica la transferencia de enfermedades.

Los métodos de conservación *in vitro* son importantes para especies que se propagan en forma agámica, que poseen genotipos altamente heterocigotas como así también para especies que producen semillas recalcitrantes. Por ende, constituyen complementos importantes para los bancos de semillas y las colecciones en campo. Si bien este método ofrece la posibilidad de conservar germoplasma a corto y mediano plazo, en un espacio más reducido y a menor costo, en relación con las colecciones en campo, existe el riesgo de pérdida de las entradas por contaminación accidental, error humano y /o por variación somaclonal y los costos de las labores por mantenimiento son altos.

La crioconservación, o almacenamiento de material biológico a temperatura de nitrógeno líquido (-196°C), es una técnica actualmente disponible que asegura la conservación a largo plazo del germoplasma vegetal (Engelmann, 2004). A esta temperatura, las divisiones celulares y los procesos metabólicos se encuentran detenidos, por lo que el material vegetal puede ser almacenado sin alteración o modificación por un período de tiempo teóricamente ilimitado (Gonzalez-Arno y Engelmann, 2006). Más aún, el material crioconservado requiere un mínimo mantenimiento, un espacio reducido y no existen riesgos de contaminaciones (Sakai, 1995, 1997; Gonzalez-Arno y Engelmann, 2006).

Todo el sistema aminora los riesgos de pérdida del germoplasma, porque cada método (bancos de semillas, colecciones en campo, cultivo *in vitro*), se complementa con el otro, de tal forma de que si se perdiera una accesión por cualquier razón, con uno de los componentes mencionados, es posible recuperarlo con el otro (Ugarte y Villarroel, 1999; Ugarte *et al.*, 2001). Se debe considerar el hecho de que los requerimientos para una conservación óptima varían entre las especies, así como también lo hacen la infraestructura disponible y los recursos humanos; es importante considerar todos estos aspectos en conjunto con los recursos socio-económicos con el fin de decidir cómo optimizar estos parámetros para la estrategia de conservación en cuestión.

En el CIP, la conservación *ex situ* del germoplasma de olluco se realiza en condiciones *in vitro* y en campo.

## 2.6 Conservación *in vitro*

La conservación *in vitro* es el respaldo en seguridad de las colecciones en campo y el proceso en el cual se liberan las accesiones de sus enfermedades y se re-juveniliza la semilla para llevarla nuevamente a campo. Esta conservación implica un proceso de introducción, limpieza de patógenos (mediante termoterapia o cultivo de meristemas, previo un diagnóstico) y conservación propiamente dicha.

El potencial de los métodos de cultivo *in vitro* para la conservación de recursos genéticos de las especies propagadas vegetativamente, fue reconocido a fines de 1970. Diez años más tarde el Consejo Internacional de Recursos Genéticos Vegetales (IBPGR) crea una comisión encargada de todos los aspectos relacionados a la conservación de recursos genéticos vegetales. Esta comisión planteó una serie de acciones relevantes a la conservación *in vitro*, identificando las especies que requieren una atención prioritaria para su conservación *in vitro* y determinando las áreas críticas de investigación se encuentran: la estabilidad genética de los materiales, la necesidad de determinar parámetros para la caracterización de material que ingrese a conservación *in vitro*, la necesidad de conocer las técnicas de indexación de patógenos a nivel de material *in vitro*, la necesidad de un eficiente mantenimiento y distribución de una colección *in vitro*, así como un eficiente sistema de documentación y manejo de datos para este fin.

Whithers (1988), planteó dos tipos de bancos de germoplasma *in vitro*: el banco de germoplasma activo (IVGA), donde los cultivos son mantenidos bajo crecimiento lento; y el banco de germoplasma base (IVBG) donde los cultivos son criopreservados.

El mantenimiento *in vitro* de grandes colecciones de germoplasma requiere de un adecuado manejo a partir del ingreso del material al banco (introducción *in vitro*), hasta su mantenimiento por periodos largos de tiempo. Es necesario estandarizar los procesos de micropropagación, los medios de conservación y las evaluaciones que deben realizarse durante el periodo de mantenimiento.

Mantener la fidelidad genética de las entradas conservadas en un banco de germoplasma, es uno de los requerimientos necesarios a cumplir en este tipo de trabajo. En algunos cultivos de propagación clonal como camote, se han reportado problemas de

estabilidad genética en colecciones mantenidas en el campo, debido principalmente a mutaciones somáticas (Miller, 1935; Rosa, 1926; Hernández y Miller, 1964; Clark y Moyer, 1988). Estos reportes indican que ciertos *loci* en el genoma de camote son menos estables que otros y que hay una variación considerable en la incidencia de variaciones somáticas entre cultivares (Hernández y Miller, 1964). Estos loci parecen estar regulando principalmente la pigmentación de la raíz (Hernandez y Miller, 1964; Clark y Moyer, 1988).

En papa, se ha determinado que la mayoría de las variedades ocasionalmente producen plantas o tubérculos que presentan un tipo aberrante, demostrándose que muchos de estos tipos aberrantes son quimeras periclinales. Esto se ha manifestado en la variedad de papa “Gladstone” cuyos tubérculos normalmente son blancos con manchas rosadas, habiéndose encontrado aberrantes que son totalmente pigmentados a excepción de los ojos del tubérculo. Al parecer el factor genético que gobierna la pigmentación se debe a la dominancia de dos genes: el gen E que gobierna la pigmentación y el gen M, que restringe la formación de pigmentos en áreas alrededor de los ojos (Howard, 1961).

La técnica de cultivo de tejidos aplicado al mantenimiento de los Bancos de Germoplasma, es una alternativa utilizada a nivel mundial. Sin embargo, desde su consecución, se han reportado problemas de estabilidad genética luego del mantenimiento del germoplasma *in vitro* (D’Amato, 1975; Larkin y Skowcroft, 1981; Karp y Bright, 1985). Estos problemas e inquietudes pueden ser considerados como un factor crítico de estudio en el uso de las técnicas *in vitro* a gran escala.

Debido a que ciertas mutaciones podrían ser difíciles de detectar, el uso de las técnicas moleculares han ampliado la posibilidad de detección de cambio a nivel de secuencias del ADN y en facilitar el análisis de estabilidad genética (Landsmann y Uhrig, 1985; Potter y Jones, 1991; Al-Zahim *et al.*, 1999; Piola *et al.*, 1999; Borner *et al.*, 2000).

## **2.7 Estabilidad Genética**

La variabilidad genética es una característica que puede ocurrir en las células vegetales que han sido sometidas a un protocolo de cultivo de tejidos. Esta variabilidad genética podría ser pre-existente en las células de la planta donante o se puede originar en

el proceso de cultivo, principalmente en la fase de callo (Singsit y Akins, 1993). Ambos podrían, aunque no siempre, influir en la estabilidad genética de las plantas regeneradas.

Muy pocos son los trabajos realizados para determinar los cambios genéticos que ocurren en el cultivo de tejidos. Se ha responsabilizado de estos cambios al estrés causado por el proceso mismo de cultivo de tejidos, lo cual podría a su vez producir alteraciones de los patrones de metilación del ADN (Brown, 1989; Kaeppler y Philips, 1993).

Mueller *et al.* (1990), determinaron alta frecuencia de metilaciones en plantas regeneradas de arroz a partir de callos. Quemeda *et al.* (1987), determinaron cambios en la metilación de ADN en plantas de soya provenientes de cultivo de células en suspensión, utilizando una enzima de restricción que reconoce la metilación del ADN.

Brown *et al.* (1991), reportaron altos niveles de variación genotípica entre plantas regeneradas de maíz y sus progenies en comparación a semillas control. Se utilizaron callos mantenidos en diferentes medios, de los cuales se regeneraron plantas. El análisis molecular usando RFLP (polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción), se realizó en los regenerantes, al haber pasado las etapas de diferenciación y organogénesis, mostraron más similaridad genética con los controles; pero también se detectaron variantes somaclonales con diferencias moleculares saltantes.

En papa, Harding (1994) usando RFLP, detecta cambios genéticos en materiales conservados *in vitro* y criopreservados. Observó cambios a nivel de genes ribosomales (rARN) a través de la variación del patrón de bandas con la misma sonda en comparación al genotipo control. Se atribuye dicho cambio a mutaciones y metilaciones en el ADN. Un inconveniente de estos estudios es que el análisis se restringe a una porción del genoma, lo que limita el estudio de estabilidad genética a los sitios en donde alguna mutación o cambios en los pares de bases hayan ocurrido.

Angel *et al.* (1996), determinaron mediante un análisis molecular, la estabilidad genética de entradas de yuca (*Manihot esculenta* Crantz) mantenidas *in vitro* en el CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical), utilizando marcadores moleculares de RFLP y RAPD (polimorfismo en el ADN amplificado al azar). No se detectó variación a nivel del ADN en plantas de yuca después de 10 años de mantenimiento *in vitro*. Sin

embargo, se sugiere aumentar el número de marcadores moleculares (RFLP, RAPD, SSR (secuencias simples repetidas) y AFLP (polimorfismo de la longitud de fragmentos amplificados)) y el número de variedades mantenidas por 10 o más años.

Aun así, se reconoce que existe poca correlación entre los resultados con un marcador y otro, en trabajos en donde se haga uso combinado de RAPD, AFLP y SSR, siendo necesario evaluar independientemente cada uno de ellos (Dávila *et al.*, 1999; Gen Lou *et al.*, 1999). Esto se refiere a que existen diferencias en el número medio de perfiles generados por par de iniciadores en cada una de las técnicas mencionadas, siendo los más altos para AFLP y SSR. Por otro lado los SSR muestran un 100% de reproducibilidad, seguidos por un 99,6% para AFLP y 84,3% para RAPD (Mc Gregor *et al.*, 2000). También se reporta que al aplicarse la técnica de AFLP en *A. salmiana* se encontró que posee una mayor robustez que RAPD, basados en los valores de bootstrap (Lara, 2005). Rout *et al.* (1998), determinaron la estabilidad genética de plantas micropropagadas de jengibre usando RAPD. Haciendo uso de 15 iniciadores arbitrarios certificaron la estabilidad genética de plantas constantemente micropropagadas en comparación con sus duplicados mantenidos en campo. El estudio no encontró variaciones significativas en las plantas micropropagadas.

Ozeki *et al.* (1997), mostraron que la inserción de un elemento transposable podría ser uno de los mecanismos que podría causar la variación en cultivo de células vegetales. Su interés principal fue determinar la causa de la inserción de un elemento transposable ubicado en el gen de la fenilalanina amonía-liasa (PAL), que normalmente es inducido durante la transferencia de células en suspensión de zanahoria a un medio líquido nuevo.

Se sugiere que se establezcan sistemas para el control de calidad, independientemente de los métodos usados de micropropagación, principalmente para el caso de cultivos perennes (Dunstan *et al.*, 1986 citado por Gupta y Varshney, 1999), así como hacer evaluaciones periódicas de los protocolos utilizados para la micropropagación. Para este fin, se ha propuesto usar los marcadores moleculares para detectar la variación genética, a nivel del ADN, en los cultivos *in vitro* y sus productos.

Gupta y Varshney (1999), plantearon el uso de marcadores moleculares para comprobar la fidelidad genética durante la micropropagación y conservación de

germoplasma. Principalmente en la industria de micropropagación masiva, es necesario mantener las características fenotípicas y genéticas de las plantas (Kumar *et al.*, 1999; Vijay *et al.*, 1995; Goto *et al.*, 1998). Esto ha sido posible con el uso de explantes organizados como yemas apicales, axilares y plántulas de embriones somáticos. Estos explantes mantienen una alta estabilidad, es decir que los cambios genéticos que podrían surgir durante la división celular son mínimas o no existentes (Vasil *et al.*, 1985, Shenoy *et al.*, 1981 citados por Gupta y Varshney, 1999; Villalobos *et al.*, 1991; Templeton-Somers y Collins, 1986; Martins *et al.*, 2004). Al respecto se informa que explantes provenientes de cultivo de callos son generalmente más susceptibles de producir variantes somaclonales (Larkin y Scowcroft, 1981; Villalobos *et al.*, 1991). Esta hipótesis la sostienen muchos autores (Hanna *et al.*, 1984; Armstrong *et al.*, 1985 citados por Gupta y Varshney, 1999).

Los marcadores genéticos moleculares incluyen: RFLP, RAPD, AFLP, SSR, entre otros. Es necesario indicar que cada uno de estos sistemas detecta solo una fracción del genoma (Gupta y Varshney, 1999), y que haciendo uso de diferentes marcadores, se podría detectar diferentes fracciones del mismo (Martins *et al.*, 2004).

Una técnica muy utilizada por las ventajas que ofrece, es el AFLP y permite la identificación de un gran número de polimorfismos con respecto a otras técnicas como los RFLP o los RAPD (Vos *et al.*, 1995). Con los AFLP, los fragmentos de ADN son amplificados usando cebadores específicos como adaptadores, los cuales son ligados a esos fragmentos. Además, el análisis AFLP es relativamente fácil de ejecutar, es altamente reproducible y utiliza cantidades pequeñas de ADN. Sin embargo, sólo unos pocos estudios para detectar variación somaclonal han sido llevados a cabo aplicando esta técnica a árboles y embriones somáticos de pecana (Vendrame, 1999), *Arabidopsis thaliana* (Polanco, 2002) y aliso (Gutiérrez, 2002 y 2004).

La determinación de variantes durante la conservación *in vitro* se ha realizado utilizando marcadores moleculares (Borner *et al.*, 2000; Gopal, 1999). Sin embargo Gupta y Varshney, 1999, sugieren que para éste propósito la caracterización genotípica usando marcadores microsátélites (SSR) y AFLP podrían tener mayor utilidad.

Por otro lado, Xena *et al.* (2000) realizaron un análisis citogenético de las plantas regeneradas a partir de callos embriogénicos de *S. tuberosum*. cv Desirée en medios

sólidos y observaron varias células mixoploides en diferentes tejidos de su población de plantas, que exhibieron un desarrollo anómalo. Los resultados sugieren que las células euploides son producto únicamente de plántulas regeneradas por embriogénesis somática.

La causa exacta de la variación somaclonal en cultivos *in vitro* son aún desconocidas, aunque se cree que las alteraciones en las concentraciones de citocinina-auxina y su proporción, la duración del cultivo *in vitro*, el estrés debido a las condiciones artificiales *in vitro*, alteración del ritmo diurno y las condiciones de nutrición específicos; juntos o por separado son responsables (Modgil *et al.*, 2005).

Perazzo (2005), evaluó la estabilidad genética de accesiones de papa conservadas *in vitro*, utilizando marcadores moleculares microsatélites SSR, los cuales certificaron la estabilidad genética de plantas constantemente micropropagadas *in vitro* en comparación con sus duplicados mantenidos en campo. Sin embargo mostró que pérdidas de identidad genética de accesiones del banco de germoplasma son causadas por mezclas mecánicas o mala identificación debido mayormente a errores humanos, que las causadas por los protocolos de conservación *in vitro* utilizados principalmente en bancos de germoplasma que mantienen grandes colecciones; por otro lado, afirma que la complementación de los descriptores morfológicos y moleculares confirman que los métodos de conservación *in vitro*, mantienen la estabilidad genética del germoplasma conservado.

Los estudios de Vargas *et al.* (2008), utilizando el análisis citogenético y marcadores RAPD, demostraron que las plantas de *Solanum tuberosum* cv. Desirée, regeneradas a partir de cultivos de células embriogénicas en suspensión, no muestran las variaciones genotípicas que son característicos de los cultivos de células en suspensión que dieron lugar a estas plantas. También indicaron que esta población de papa es muy homogénea y estable genéticamente, concluyendo que el sistema de embriogénesis de alta frecuencia es un método adecuado para la regeneración a gran escala de plantas de papa.

Medina *et al.* (2007), reportaron que el uso de marcadores moleculares RAPD han sido problemáticos e inconclusos. En algunos estudios han indicado la no detección de variación somaclonal usando esta técnica. Sin embargo, el manejo de marcadores moleculares polimórficos AFLP en *Hevea*, permite confirmar la aplicabilidad de esta técnica molecular al estudio de la estabilidad genética de los materiales embriogénicos.

Estos resultados verifican que la técnica es válida para distinguir la variación genética entre líneas de cultivo de embriones somáticos de *Hevea brasiliensis*. La técnica de los AFLP puede detectar variaciones genotípicas de una línea embriogénica a otra.

Peredo *et al.* (2008) analizaron la estabilidad genética y epigenética de clones conservados *in vitro* y criopreservados de lúpulo (*Humulus lupulus* L.). Para estimar la estabilidad genética utilizaron las técnicas de RAPD y AFLP, las cuales revelaron que no había ninguna variación cuando se compararon con los controles conservados en el invernadero y los respectivos clones conservados *in vitro* y bajo criopreservación. La estabilidad epigenética fue evaluada utilizando la técnica de polimorfismo de amplificación sensible a metilación o MSAP (methylation-sensitive amplification polymorphism) y reportaron que alrededor de 36% de los *loci* fueron polimórficos cuando compararon clones conservados *in vitro*, y clones criopreservados, con los respectivos clones parentales mantenidos en el invernadero. Responsables de esta variación epigenética serían las variaciones en los patrones de metilación y demetilación.

Los marcadores moleculares, basados en el ADN, proporcionan una forma eficiente de tamizar mutaciones inducidas en el cultivo de tejidos, ya que estos no son afectados por los factores ambientales (Peredo *et al.*, 2009).

Castillo *et al.* (2010) determinaron que no se mantiene la estabilidad genética de las accesiones estudiadas en medios de conservación conteniendo manitol, por tanto, sugieren la utilización de nuevos retardadores del crecimiento, como el sorbitol y acimidol, que se han empleado con éxito en la conservación a mediano plazo del germoplasma de papa a nivel mundial.

La técnica de *AFLP* logró detectar los cambios que se produjeron a nivel de ADN y que no fueron detectados a nivel isoenzimático. Estudios recientes confirman la eficiencia de esta técnica y otras de marcadores moleculares, en la determinación de la estabilidad genética en plantas de papa derivadas de cultivo *in vitro* (Mandolina *et al.*, 2007; Chimot *et al.*, 2007), así como en otros cultivos (Legesse *et al.*, 2007; Sorkheh *et al.*, 2007; Perera *et al.*, 2010).

Es siempre necesario integrar el uso de evaluaciones morfológicas con moleculares para la determinación de la estabilidad genética. Este trabajo de investigación trata de la evaluación de germoplasma de olluco y diseña el uso de controles de identidad como parte de la rutina del trabajo tanto de micropropagación como conservación.

## **2.8 Variabilidad y Diversidad Genética**

Ugarte *et al.* (1996) reportaron de un total de 97 accesiones de olluco, 21 morfotipos y una variabilidad aproximada de 50 entradas en el Centro Toralapa (Bolivia). Posteriormente, con componentes principales hallados se obtuvo 20 morfotipos de olluco (Cadima *et al.*, 1997). Con la verificación morfológica de los grupos formados se determinó que existen 28 morfotipos de un total de 130 accesiones del germoplasma de olluco. Estos resultados permitieron apreciar preliminarmente que la variabilidad genética en papalisa es de 22% y que el 78% lo constituyen duplicados (Ugarte, 1998). Ugarte y Villarroel (1999) identificaron 42 morfotipos en la misma colección, pero con 200 accesiones.

Tapia *et al.* (2004) identificaron 20 morfotipos de 239 accesiones en la colección nacional de olluco de Ecuador. Al correlacionar los morfotipos de cada una de las colecciones con los patrones de malatodeshidrogenasa (MDH), se obtuvieron 55 grupos, lo que significaría el 23% de la variabilidad.

Malice (2009) reportó 108 morfotipos para la colección de olluco conservada en el Centro Internacional de la Papa (CIP, Lima, Perú). Este trabajo fue la consolidación de 5 campañas de caracterización de 187 accesiones colectadas en germoplasma de regiones representativas, y siguiendo un gradiente longitudinal y latitudinal del norte de Perú al norte de Bolivia.

Parra-Quijano *et al.* (2011) identificaron 2 grupos en la colección de campo e *in vitro* de la Universidad Nacional de Colombia (Bogotá) conformada por 36 accesiones; 8 de 14 accesiones del noreste de los Andes de Colombia fueron incluidos en el primer grupo; mientras que las seis accesiones restantes, 16 accesiones del suroeste de los Andes colombianos, y cinco accesiones del Perú se agruparon en el segundo grupo.

## 2.9 Métodos para el Análisis de Estabilidad Genética, Diversidad Genética y Verificación de Identidad.

### 2.9.1 Índices de Similitud

Se usa para comparar materiales cuyas características son evaluadas en una escala nominal, o binomial (doble estado: presencia o ausencia). A partir de la matriz básica de datos se calcula los coeficientes, y con ello, se construye una matriz de similitud (Crisci *et al.*, 1983; Hair *et al.*, 1992). Sus valores varían entre cero y uno, siendo el valor cero el de máxima similitud, y el valor uno, el mínimo. Entre los índices más usados están: Simple Matching (Sokal y Sneath, 1963), Jaccard (Jaccard, 1908), Dice (Dice, 1945), Nei (Nei y Li, 1979), Gower (Gower, 1971), entre otros.

Los coeficientes de asociación miden las coincidencias y diferencias en los estados de los caracteres entre dos OTUs (Unidades Operativas Taxonómicas); requiere de caracteres de tipo doble estado (1,0).

		OTUa	
		1	0
OTUb	1	1.1 A	1.0 B
	0	0.1 C	0.0 D

1= Presente; 0= Ausente.

#### a. Índice de Simple Matching

El Índice de Simple Matching “SM” (Sokal y Sneath, 1963) considera la similitud entre dos unidades operativas taxonómicas (OTU) como el número de atributos compartidos (presentes y ausentes) dividido por el número total de atributos compartidos y no compartidos.

$$SM = \frac{A+D}{A+B+C+D}$$

Donde A es el número de atributos presentes en el OTU “a” y “b”, D es el número de atributos ausentes en el OTU “a” y “b”, C el número de atributos presentes solo en el OTU “a”, y B el número de atributos presentes solo en el OTU “b”.

### **b. Índice de Similitud Jaccard**

El Índice de similitud Jaccard (Jaccard, 1908) considera la similitud entre dos unidades operativas taxonómicas (OTU) como el número de atributos compartidos dividido por el número total de atributos presentes en cualquiera de ellos. El índice de Jaccard se puede expresar de la siguiente manera:

$$J = C / A + B - C$$

Donde A es el número de atributos presentes en el OTU “a”, B es el número de atributos presentes en el OTU “b”, y C es el número de los atributos presentes en ambos OTUs. El número de atributos presentes en cualquiera de los OTUs (N) está dada por  $A + B - C$ .

### **2.9.2 Análisis de Conglomerados**

Se aplica sobre una matriz de distancias. Se utiliza el agrupamiento jerárquico que se caracteriza por sucesivas funciones para formar los grupos. El procedimiento parte de la existencia inicial de un conglomerado para cada entrada o sub población, que, por aproximaciones sucesivas, se van uniendo a otras en grupos hasta formar un conglomerado único, que incluye a todas. Los resultados se presentan en un fenograma o dendrograma dependiendo del tipo de datos (López e Hidalgo, 1994).

La rigidez de los métodos jerárquicos es la clave de su éxito (requieren poco tiempo de cálculo) y a la vez, su mayor desventaja (inhabilidad de corregir acciones erróneas), pero tienen mucha utilidad en la biología para la clasificación de plantas y animales. Se han desarrollado muchos métodos jerárquicos utilizados particularmente en el campo de la taxonomía numérica (Kauffman y Rosseeuw, 1990).

### **a. Método de Agrupamiento UPGMA**

El método UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) desarrollado por Sokal y Sneath (1963); Sneath y Sokal (1973) es un método típico fenético y es el más simple usado en taxonomía numérica ya que emplea algoritmo de agrupamiento secuencial, en el que las relaciones topológicas se identifican en orden de similitud, y el árbol dicotómico o fenograma se construye paso a paso. El agrupamiento de accesiones se realiza de acuerdo con el grado de similitud entre OTUs; los OTUs más similares entre si se tratan como un nuevo OTU simple, y así subsiguientemente hasta quedar finalmente con sólo 2 OTUs (Li y Graur, 1991).

### **b. Clusters Jerárquicos, Secuenciales, Aglomerativos y Exclusivos (SAHN)**

Realiza los diferentes algoritmos de agrupamiento que Sneath y Sokal (1973) se refieren como: métodos de agrupamiento secuencial, aglomerativo, jerárquico y anidado. Dunn y Everitt (1982) ellos dan ejemplos claros de los distintos métodos de agrupamiento. Los métodos de agrupamiento aglomerativo no están bien definidos con respecto al tratamiento de los nodos. La mayoría de ellos simplemente ignoran el problema y utilizan el primer valor encontrado. Mediante el software NTSys, la aplicación que permite realizar el análisis de conglomerados mediante SAHN, ofrece opciones para lidiar con los nodos.

### **c. Método de Neighbor-Joining**

Saitou y Nei (1987) desarrollaron un método de agrupamiento más sofisticado llamado neighbor-joining. Este algoritmo produce árboles aditivos y no asume rangos evolucionarios idénticos a través de todas las ramas, más recientemente usados para árboles basados en datos de ADN o secuencias de proteínas. El método de neighborjoining está basado en el criterio de mínima evolución, es decir, la topología que da la menor longitud de la rama total es preferida en cada paso del algoritmo. Aunque el método no podría encontrar la verdadera topología del árbol con al menos el total de ramas porque es un algoritmo voraz que construye el árbol de una manera gradual. En este sentido, a pesar de ser un método sub-óptimo, ha sido ampliamente usado y por lo general se encuentra un árbol que está muy cerca del árbol óptimo. La principal virtud de este método con respecto

a otros métodos es su eficiencia computacional y puede ser utilizado en grandes conjuntos de datos en los que otros análisis son computacionalmente prohibitivos (por ejemplo, la evolución mínima, máxima parsimonia, máxima verosimilitud). A diferencia del algoritmo UPGMA para la reconstrucción del árbol, el método neighbor-joining no supone que todos los linajes evolucionan al mismo ritmo (hipótesis del reloj molecular) y produce un árbol sin raíces (Atteson, 1997).

### **2.9.3 Prueba de Remuestreo (Boopstrap)**

El bootstrapping (o bootstrap) es un método de remuestreo propuesto por Efron (1979). Se utiliza para aproximar la distribución en el muestreo de un dato estadístico. Se usa frecuentemente para aproximar el sesgo o la varianza de un estadístico, así como para construir intervalos de confianza o realizar contrastes de hipótesis sobre parámetros de interés. Felsenstein (1985) desarrolló una aplicación no paramétrica del “bootstrap” para evaluar el soporte estadístico de las ramas internas en un árbol o dendrograma. Los datos “bootstrap” se generan por selección aleatoria con reemplazo de los caracteres (marcadores) a partir de los datos originales para generar matrices de datos pseudo-replicadas del mismo tamaño de la matriz original. Este proceso se repite por un gran número de veces, de 50 a 100; pueden dar resultados útiles, y se evalúan las proporciones de concordancia de la topología con el árbol original (Efron *et al.*, 1996; Alfaro *et al.*, 2003). Hillis y Bull (1993), determinaron que las ramas que tienen un “bootstrap” mayor a 70% tienen una probabilidad de 95 % de ser correctas, un valor mayor a 50% también es considerado un buen indicador estadístico de soporte de topología de una rama (Highton, 1993).

### **2.9.4 Métodos Multivariados**

#### **a. Análisis de Coordenadas Principales (ACoP)**

Es parte de una matriz de distancias y se busca una configuración  $Y$ , en un espacio euclídeo en el que las distancias entre los puntos sean las contenidas en la matriz. Este tipo de técnicas permiten la representación euclídea en una dimensión reducida de espacios abstractos en los que la medida de la similitud o de la disimilitud no tiene una interpretación física concreta (López e Hidalgo, 1994).

## **b. Test de Mantel**

El test de Mantel (Mantel, 1967) evalúa las correlaciones entre matrices de distancia, de similaridad o de correlaciones por la correlación de Pearson ( $r$ ) y el rango de  $r$  va de -1 a 1, donde la máxima correlación está dada por la mayor proximidad al valor absoluto de 1.

$$Z = \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n x_{ij} y_{ij}$$

La prueba de Mantel (Mantel 1967; Mantel y Valand 1970) es una prueba estadística extremadamente versátil que tiene muchos usos, incluyendo el análisis espacial. La prueba de Mantel examina la relación entre dos matrices cuadradas (a menudo matrices de distancia) X y Y. Los valores dentro de cada matriz ( $X_{ij}$  o  $y_{ij}$ ) representan una relación entre los puntos  $i$  y  $j$ . La relación representada por una matriz puede ser una distancia geográfica, una distancia de datos, un ángulo, una matriz binaria, o casi cualquier otro dato imaginable. A menudo, una matriz es una matriz binaria que representa una hipótesis de las relaciones entre los puntos o algún otro tipo de relación (por ejemplo,  $X_{ij}$  puede ser igual a 1 si los puntos  $i$  y  $j$  son del mismo país, y 0 si no lo son). Por definición, las diagonales de ambas matrices están siempre llenos de ceros.

### **2.9.5 Índices de Diversidad Genética**

#### **a. Diversidad Genética de Nei (D)**

El índice de diversidad genética desarrollado por Nei (1973), es la probabilidad de que, en un locus único, cualquier par de alelos, escogidos al azar de la población, sean diferentes entre sí. La Diversidad genética promedio de todos los loci es una estimación del grado de variabilidad genética en la población, se calcula al restar de 1 las frecuencias esperadas de homocigotos en un locus. La operación se repite para todos los loci y luego se saca el promedio. Puede aplicarse para todos los marcadores, ya sean codominantes o dominantes y su valor para el caso de marcadores dominantes varía de 0 a 0.5. A mayor valor del índice, mayor diversidad.

### **2.9.6. Análisis de varianza molecular – AMOVA**

El análisis de varianza molecular (AMOVA) se utiliza a menudo con datos de marcadores moleculares dominantes. Funciona con las distancias entre individuos y se calcula la variación entre y dentro de los grupos predefinidos y permite poner a prueba diferentes estructuras genéticas particulares. Originalmente, el cuadrado de las distancias euclidianas era preferido, pero se obtuvieron resultados muy similares como por ejemplo, el coeficiente de similitud de Jaccard. Los componentes de la varianza pueden ser calculados para cada nivel jerárquico. El AMOVA ha demostrado ser muy útil para la partición de la variación en especies silvestres y de los grupos de variedades procedentes de diferentes regiones (Excoffier *et al.*, 1992).

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 Lugar de ejecución

La presente investigación se realizó en el laboratorio de Cultivo de Tejidos del Banco de Germoplasma y en el laboratorio de Marcadores Moleculares II de la Unidad de Biotecnología Aplicada del Centro Internacional de la Papa (CIP), en La Molina, Lima. La caracterización morfológica se efectuó en la Estación Experimental Santa Ana, Huancayo, en el Campo Experimental Chalaspampa a una altitud de 3827 m., entre las coordenadas 11°50'15" de latitud sur y 75°18'12" de longitud oeste, del anexo de La Libertad, ubicado al norte de Huancayo a una distancia de 40 Km., a la margen derecha de la carretera que conduce hacia las provincias de Jauja y Yauli. Políticamente pertenece al distrito Heroínas Toledo, Provincia Concepción, departamento de Junín. Esta región presenta una zona de vida natural bosque pluvial Montano (bp-M), con una precipitación anual promedio de 650 mm, temperatura promedio de 7.5 °C, presencia de heladas con descensos de temperatura de hasta -6 °C.

#### 3.2 Material vegetal

Un total de 236 accesiones de olluco del banco de germoplasma del Centro Internacional de la Papa conservadas *in vitro* entre 03 años y un máximo de 22 años y sus respectivos clones originales mantenidos en campo (ANEXO 2), fueron caracterizadas morfológicamente según descriptores IPGRI/CIP (2003) (ANEXO 4) y molecularmente, usando seis combinaciones de iniciadores AFLP (Cuadro 1), durante las campañas 2011-2012 y 2012-2013.

### **3.3 Métodos**

#### **3.3.1 Preparación del material *in vitro* para la siembra en campo.**

##### **a. Propagación *in vitro* del material vegetal**

Se propagaron plántulas provenientes del Banco de Germoplasma *in vitro* en tubos autoclavables Pyrex, colocando 6 a 8 nudos en cada tubo que contenía 10 ml. de medio de propagación para olluco (Figura 2 y ANEXO 6).

##### **b. Aclimatación**

Después de un mes, las plántulas provenientes de condiciones *in vitro*, fueron transferidas a un sustrato compuesto por musgo y perlita (Jiffy-7 Peat pellets 42 mm (Jiffy Products® Products)) (Figura 2). Se eliminó los residuos de medio de cultivo en las raíces de las plántulas, colocándolas en el sustrato por 20 días en una cámara de crecimiento (18°C, 16 horas luz, 70% de humedad). Transcurrido este periodo, el material fue trasladado al invernadero.

##### **c. Propagación del material vegetal en invernadero**

Finalizada la etapa de aclimatación, el material fue sembrado en macetas de 8 pulgadas para la producción de tubérculos. Después de cuatro meses, se realizó la cosecha del material. Los tubérculos obtenidos fueron seleccionados, desinfectados y trasladados a la Estación Experimental del CIP en Huancayo (75°W, 12°S, 3200 msnm) para la siembra en campo. A partir de las plantas de accesiones que no produjeron tubérculos se tomaron los esquejes apicales del tallo para su respectiva propagación. Los esquejes fueron cultivados en un sustrato de musgo y perlita (Jiffy-7 peat pellets 42 mm (Jiffy Products®)), usándose 8 a 10 esquejes apicales por cada accesión. Después de enraizados los esquejes, fueron trasladados a la Estación Experimental del CIP en Huancayo para la siembra en campo. Paralelamente el material proveniente de campo, utilizado como control (tubérculo-semilla), fue seleccionado para la siembra con el material proveniente de *in vitro* (Figura 2).



**Figura 2.** Flujo de actividades realizadas para la caracterización morfológica en la evaluación de la estabilidad genética de germoplasma de olluco conservado en el banco de germoplasma. **A.** Selección de material *in vitro*. **B, C.** Aclimatación. **D, E.** Preparación para la cosecha de tubérculos. **F.** Plantas en desarrollo en el campo experimental.

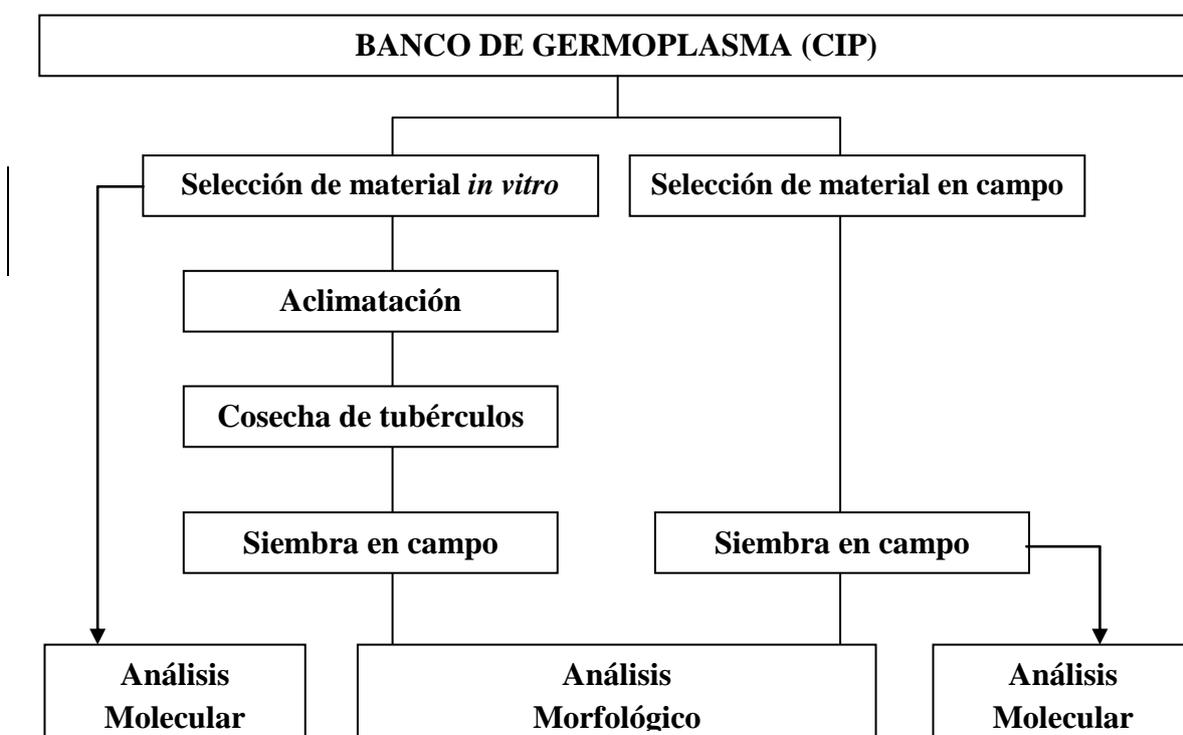
#### d. Caracterización morfológica

Se evaluaron las accesiones de olluco provenientes de conservación *in vitro*, y sus respectivos clones provenientes de campo, mediante los descriptores morfológicos (ANEXO 4) para planta, tallo, hoja, flor y tubérculo desarrollados (IPGRI/CIP, 2003).

La caracterización morfológica fue realizada periódicamente, desde los 60 días después de la siembra hasta la cosecha de los tubérculos; considerando en la evaluación, los períodos de floración, fructificación y tuberización (Figura 3).

Para poder realizar las comparaciones morfológicas de las 236 accesiones, los clones de cada accesión procedentes de diferentes sistemas de conservación (campo - *in vitro*) fueron sembrados en surcos contiguos y cada clon representado por 7 plantas por surco (unidad experimental).

Los 21 descriptores morfológicos para la caracterización básica de colecciones de olluco (IPGRI/CIP, 2003) fueron utilizados y se comparó cada una de ellas en ambos grupos (*in vitro* y campo) (ANEXO 4).



**Figura 3:** Flujograma de la metodología para el análisis de la estabilidad genética de germoplasma de olluco conservado en el banco de germoplasma del CIP.

### **3.3.2 Caracterización Molecular**

#### **a. Obtención de muestras**

Las muestras *in vitro* fueron adquiridas del laboratorio de cultivo de tejidos, obteniéndose 2 tubos de cada accesión, conteniendo cada uno de 4 a 6 plántulas micropropagadas. Las muestras de campo fueron tomadas directamente del campo experimental donde se realizaron las evaluaciones morfológicas (CIP-Huancayo) y constaron de hojas jóvenes, las que fueron debidamente agrupadas, etiquetadas, envueltas en papel toalla húmeda y conservada en paquetes de polietileno para su traslado de inmediato al laboratorio de marcadores moleculares II (CIP-Lima).

#### **b. Extracción de ADN**

La extracción del ADN total se realizó a partir de hojas jóvenes usando el protocolo de extracción de pequeña escala (Doyle y Doyle, 1990) usado por el CIP (1997). La concentración y calidad del ADN fue calculada en los espectrofotómetros NanoDrop 1000 y 2000. Todos los procesos de extracción fueron realizados en los laboratorios del CIP-Lima.

#### **c. Análisis Molecular AFLP**

Los protocolos de AFLP se basan en Vos *et al.* (1995) y adaptados para ser visualizados por electroforesis en el sistema de análisis de ADN LI-COR 4300. Los protocolos de digestión, ligación, preamplificación y electroforesis son los reportados en el Manual del CIP (1997). Los detalles de la mezcla de PCR y programas de amplificación se encuentran en el ANEXO 3.

El tamaño de las bandas (pares de bases) AFLP amplificados se determinaron usando el marcador de peso IRD y 50-Obp (LI-COR® USA) y la ayuda del Programa SAGA GENERATION 2 (LI-COR® USA).

### 3.4 Análisis de Datos

El registro de datos para la caracterización morfológica de 236 accesiones de olluco conservado en *in vitro* fue realizado, de manera complementaria a las accesiones conservadas en campo y con información generada para marcadores moleculares AFLP. Es preciso mencionar que a pesar de haber trabajado inicialmente con más de 300 accesiones solo en 236 se logró completar información tanto de caracterización morfológica y molecular de accesiones conservadas *in vitro* y en campo, contabilizando un total de 472 muestras analizadas molecular y morfológicamente.

Para el análisis, cada carácter asignado a cada planta dentro de cada grupo de clones (*in vitro* y campo) fue registrado en una hoja de Excel. De las 7 plantas evaluadas, en cada clon, se obtuvo la moda; y se comparó la moda obtenida de los clones (*in vitro* y campo) de cada accesión. Este procedimiento fue realizado para todos los 21 descriptores evaluados en cada accesión. Para el análisis, se utilizó el programa de taxonomía numérica NTSYSpc-2,02h (Numerical Taxonomical System), permitiendo agrupar el material por similitud morfológica según distancia genética, y el método de agrupamiento por medias aritméticas no ponderadas (UPGMA unweighed pair-group method using arithmetic averages).

El patrón de bandas AFLP para cada accesión fue registrado manualmente en una matriz binaria en una hoja de Excel. Las bandas presentes se registraron como 1 y las ausentes como 0.

Para evaluar la estabilidad genética de las 236 accesiones de olluco, y establecer las relaciones de similitud entre las muestras (*in vitro* y campo), se realizó un análisis de agrupamiento mediante el índice de similitud Simple Matching (Sokal y Sneath, 1963) (que considera la similitud tanto en presencia y ausencia de atributos entre OTUs), y el método de agrupamiento UPGMA. Para este propósito se utilizó el “Sequential Agglomerative Hierarchical Nested - SAHN” (Sneath y Sokal, 1973), mediante el software NTSYSpc, 2.2 con una prueba de remuestreo (boopstrap).

La estabilidad genética se fundamentó por la verificación de identidad de los materiales procedentes de *in vitro* y campo, mediante el análisis de marcadores AFLP y la

evaluación de las características morfológicas (identificación de morfotipos). Se define como un morfotipo a todos los clones que presenten el 100% de similitud en los caracteres morfológicos evaluados (Sevilla y Holle, 2004).

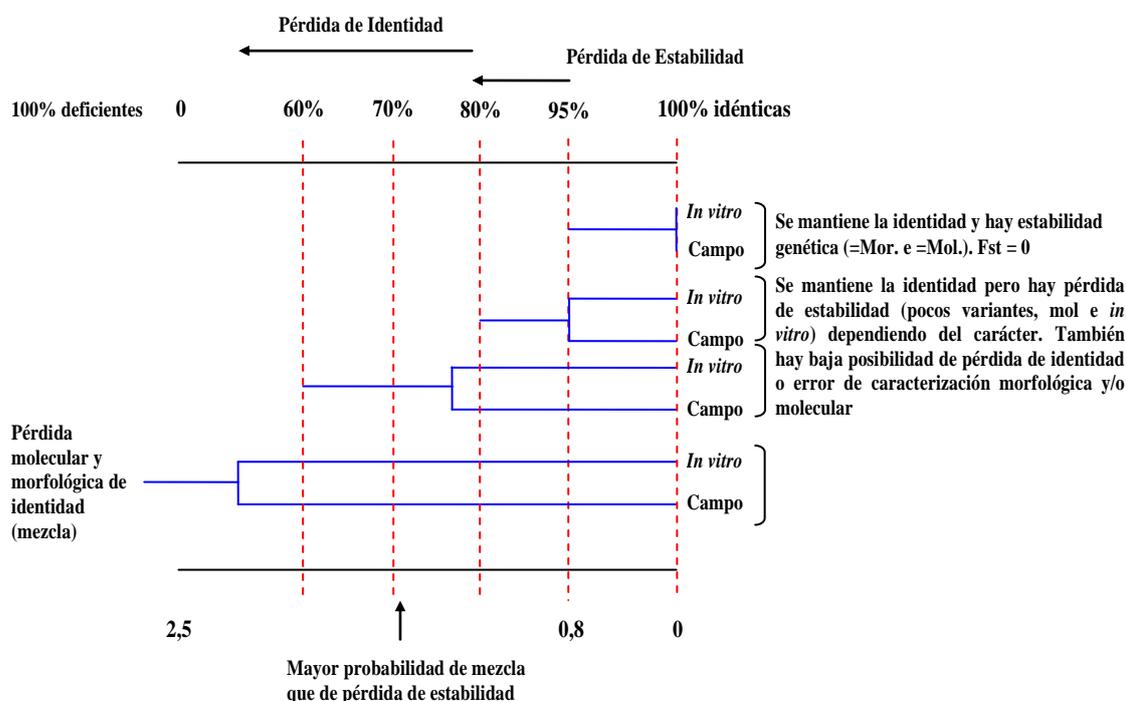
Para validar los resultados de estabilidad genética al 0.95 de índice de similitud según marcadores moleculares se realizó un análisis de varianza molecular (AMOVA) entre las accesiones conservadas *in vitro* y sus respectivos clones originales mantenidos en campo, en el cual el valor del estadístico  $F_{st}$  similar a cero indico la no existencia de variancia genética significativa según los estándares de Wright (creador de los índices F para estudios de genética de poblaciones) (Hartl y Clark, 1997).

$F_{st} = 0.05 - 0.15$ : moderadamente diferenciado.

$F_{st} = 0.15 - 0.25$ : gran diferenciación.

$F_{st} > 0.25$ : muy grande diferenciación.

Para evaluar el grado de relación entre las matrices de similitud morfológica y molecular, se realizó un test de asociación de matrices, utilizando una transformación a matrices comparables mediante un índice de correlación cofenético.



**Figura 4.** Consideraciones para el establecimiento de estabilidad genética según marcadores moleculares y morfológicos.

El análisis de diversidad genética fue realizado en las accesiones que resultaron con mantener estabilidad genética, para ello se usó la información de los marcadores moleculares AFLP generados con las 6 combinaciones de iniciadores. Se utilizó el índice de similitud de Jaccard (1908) (por considerar la presencia de atributos compartidos). Para ello se usó el software Darwin 5.0. Además se calculó el índice de diversidad de Nei (1973) y mediante el software Arlequin 3.11, se realizó un AMOVA entre las accesiones de norte centro y sur, para determinar las diferencias y similitudes según marcadores AFLPs. La identificación de accesiones duplicadas se basó en el análisis de diversidad genética de las accesiones con verificación de identidad.

El análisis de diversidad morfológica, se realizó a las 151 accesiones consideradas genéticamente estables, gracias a ello se determinó la presencia de morfotipos y adicionalmente se realizó un análisis de componentes principales para determinar aquellos descriptores con alto valor de discriminación y aquellos que no proporcionan información que permita distinguir morfotipos en las distintas campañas.

## IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 Resultados

#### 4.1.1 Caracterización Morfológica

El cálculo de la matriz de similitud en base a distancia genética permitió determinar el grado de semejanza morfológica entre las accesiones conservadas *in vitro* y en campo, el análisis de la matriz de similitud entre homólogos *in vitro* y campo, según distancia genética, dio valores de 0.0 que indica 100% de similaridad morfológica y un valor máximo de 2.5 que indica una alta disimilaridad morfológica.

Utilizando los datos de la caracterización morfológica se construyó la matriz conjunta de las 236 accesiones conservadas *in vitro* y en campo. Se observó la existencia de un error de subjetividad en la evaluación de los descriptores morfológicos de olluco. Los descriptores registrados muy cambiantes entre diferentes fechas de evaluación y dependientes de condiciones fisiológicas y ambientales, son la elongación de la planta, color de follaje, floración y forma de raquis principalmente. Estos ocasionan un índice de similitud según distancia genética, basados en descriptores morfológicos, de 0.8 como valor máximo. Para la consideración de estabilidad morfológica se considera valores de índice de similitud, según distancia genética, menores a 0.8 ya que estos no indican una verdadera variación en el fenotipo.

#### 4.1.2 Caracterización Molecular

##### 4.1.2.1 Selección de las mejores combinaciones de iniciadores AFLP

Las combinaciones de iniciadores AFLPs fueron seleccionadas de una prueba de 148 combinaciones de iniciadores con 3 pares de bases selectivos (+3). Se eligieron 6 combinaciones de iniciadores (Cuadro 1) por presentar el mayor polimorfismo y una buena resolución de las bandas.

**Cuadro 1. Combinaciones de iniciadores AFLPs (Eco+3/Mse+3) usados en la caracterización molecular del olluco.**

Cod. Lab	Iniciadores selectivos	
	(Eco+3/Mse+3)	Secuencia (5'-3')
E35-M59	E-ACA	GACTGCGTACCAATTC-ACA
	M-CTA	GATGAGTCCTGAGTAA-CTA
E36-M43	E-ACC	GACTGCGTACCAATTC-ACC
	M-ATA	GATGAGTCCTGAGTAA-ATA
E37-M39	E-ACG	GACTGCGTACCAATTC-ACG
	M-AGA	GATGAGTCCTGAGTAA-AGA
E38-M54	E-ACT	GACTGCGTACCAATTC-ACT
	M-CCT	GATGAGTCCTGAGTAA-CCT
E39 M40	E-AGA	GACTGCGTACCAATTC-AGA
	M-AGC	GATGAGTCCTGAGTAA-AGC
E45-M51	E-ATG	GACTGCGTACCAATTC-ATG
	M-CCA	GATGAGTCCTGAGTAA-CCA

#### **4.1.3 Evaluación de la estabilidad genética de la colección de olluco conservado en campo e *in vitro***

De las 236 accesiones evaluadas de olluco con un total de 142 marcadores AFLP polimórficos, con índice de contenido polimórfico (PIC) mayor a 0.1, se identificaron 156 accesiones genéticamente estables, correspondiendo a genotipos con un coeficiente de similitud mayor a 0.95 y morfológicamente con una distancia genética menor a 0.8 entre par de clones conservados en campo e *in vitro*. Las 80 accesiones restantes presentan valores en coeficiente de similitud que van de 0.6 a 0.95, y distancias genéticas que van de 0.8 a 2.5.

Las 156 accesiones consideradas estables genéticamente y confirmadas morfológicamente representan el 66.1 % del total de 236 accesiones analizadas.

El agrupamiento al 0.95 de similitud se muestra en la figura 4, donde se observan pares de clones formando un solo grupo o formando grupos con otros clones de accesiones genótipicamente similares (SM= 0.95), pero con diferencias morfológicas, además se observan clones de accesiones que no se agrupan con su par homólogo de campo o *in vitro* ya que estas presentan 0.60 de similitud genotípica entre sí, y por tanto forman parte de grupos muy alejados dentro del dendograma. De manera similar existen accesiones que

morfológicamente presentan 100% de similitud (distancia genética= 0) pero no corresponden con la alta variación molecular (Cuadro 2).

Las distancias genéticas menores a 0.8 representan de 3 o 4 descriptores, que corresponden a los descriptores dependientes de condiciones fisiológicas y ambientales.

**Cuadro 2. Agrupación de accesiones según índice de similitud SM (molecular) y distancia genética (morfológica).**

Marcadores AFLP (índice de similitud)	Numero de accesiones	Marcadores Morfológicos (distancia genética)	Numero de accesiones	Coincidencia
1.0 - 0.95	177	0.0 - 0.8	185	156 coinciden
0.95 - 0.8	20	0.8 - 1.5	39	80
0.8 - 0.6	39	1.5 - 2.5	12	no coinciden
Total	236		236	

**Comparación de la variación genética entre la conservación en campo e *in vitro***

El análisis de variancia molecular (AMOVA) entre las accesiones clones conservadas *in vitro* y campo con un coeficiente de similitud SM mayor a 0.95, dieron un  $F_{st}$  similar a cero ( $\approx 0$ ), lo que indica que no existe diferenciación molecular representativa.

**Correlación entre datos morfológico - molecular**

Los resultados del test de asociación, indicaron una baja correlación de los agrupamientos fenotípico y molecular; siendo el valor negativo, por tratarse de dos métodos de agrupamiento distintos.

Correlación de matrices:  $r = -0.23198$

(Normalizado Z estadístico mantel)

Mantel t-test aproximado:  $t = -19.0356$

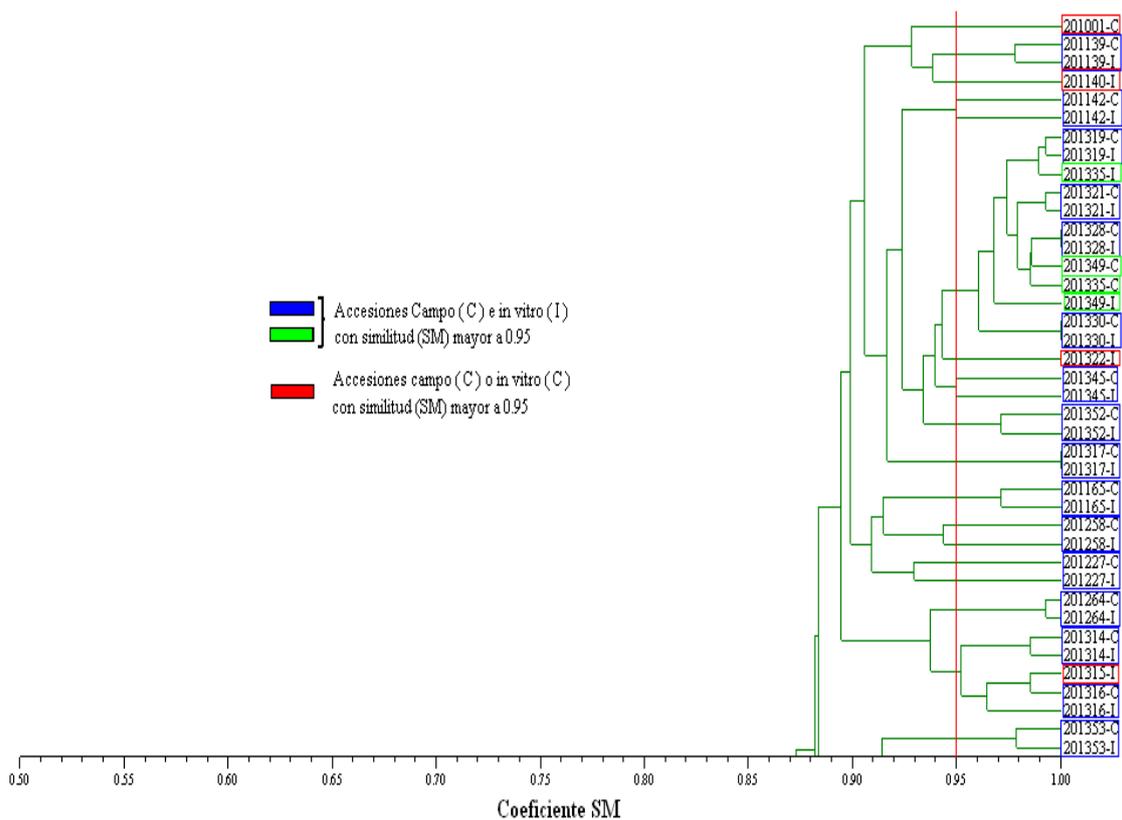
Probabilidad randomizada  $Z < obs. Z$ :  $p = 0.0000$

## **Determinación de la relación con el tiempo de conservación**

La variación genética de las accesiones analizadas no presentan una relación directa con el tiempo de conservación *in vitro* al que las plantas estuvieron sujetas; sin embargo, gran parte de las accesiones con un índice de 0.60 de similitud entre pares de clones, sus homólogos *in vitro* registran tiempos de conservación de 21 años en su mayoría, presentándose algunos casos con 3 años de conservación (ANEXO 2). Por otro lado accesiones con 1.0 de similitud entre par de clones conservados en campo e *in vitro* presentan tiempos de conservación de 19, 15 y 3 años, de la misma manera en accesiones con 0.95 de similitud entre pares de clones. Cabe indicar que el 33% de las accesiones evaluadas no cuentan con la fecha de introducción a *in vitro*, lo que dificulta hacer una inferencia entre variación genética versus el tiempo de conservación *in vitro*. No se cuenta con cantidades constantes de accesiones introducidas dentro de rangos (en años) constantes, sin embargo dentro de rangos de 10 años, la proporción entre accesiones conservados por más de 10 años con un índice de similitud mayor a 0.9, es idéntica a las accesiones con un índice de similitud menor a 0.9. De modo análogo accesiones con menos de 10 años de conservación tienen índices de similitud mayores a 0.9 en la misma proporción que accesiones con índices de similitud menor a 0.9.

### **4.1.4 Verificación de identidad de accesiones de olluco**

En base a los resultados obtenidos en el análisis de estabilidad genética con 0.95 de similitud genotípica, se estableció la verificación de identidad para 156 accesiones de las 236 evaluadas. Estas presentan genotipos con variación molecular no representativa, posiblemente atribuibles a la subjetividad durante el escoreo o error de amplificación. Las 80 accesiones restantes presentan variaciones genéticas en base a marcadores AFLP y descriptores morfológicos, por tanto necesitan una reevaluación, que confirme los resultados. En algunos casos donde se presentan coeficientes de similitud entre 0.8 - 0.95, no se manifiestan diferencias morfológicas, pero para valores menores a 0.8 de similitud, hay cierta correspondencia entre alta variación molecular y alta variación morfológica, aunque por la cantidad de accesiones (4 en total) no son representativos.



**Figura 5.** Análisis de agrupamiento de accesiones, mediante el índice de similitud SM utilizando 142 marcadores AFLP. Se considera que no existe variación genética significativa entre pares de clones provenientes de conservación *in vitro* y campo, para valores del índice SM mayores a 0.95.

#### 4.1.5 Diversidad genética de olluco mediante marcadores AFLP

Se procedió al análisis de diversidad genética de 151 accesiones aparentemente estables genéticamente, con identidad verificada y lugar de origen de colecta debidamente identificado (de las 156 accesiones, 4 no tenían lugar de origen identificado). El análisis de agrupamiento se realizó utilizando el índice de similitud Jaccard y un agrupamiento Neighbor Joining, resultando un dendrograma, en el cual para un coeficiente de 0.47, se observan 3 grupos definidos como I, II y III; el grupo I y II presentan 3 sub grupos . En el grupo I: el subgrupo 1 incluye con mayor frecuencia accesiones del norte y en menor frecuencia accesiones del centro, el subgrupo 2 incluye accesiones del norte y centro, y el subgrupo 3 incluye accesiones del centro. En el grupo II: el subgrupo 1 incluye con mayor frecuencia accesiones del sur, el subgrupo 2 incluye con mayor frecuencia accesiones del centro, y el subgrupo 3 incluye accesiones del norte – centro – sur. En el grupo III se

incluyen únicamente accesiones provenientes de la región centro del Perú (Figura 6). Las accesiones provenientes de Bolivia, están distribuidos en subgrupos conformados por accesiones del sur y centro del Perú.

**a. Análisis de varianza molecular (AMOVA)**

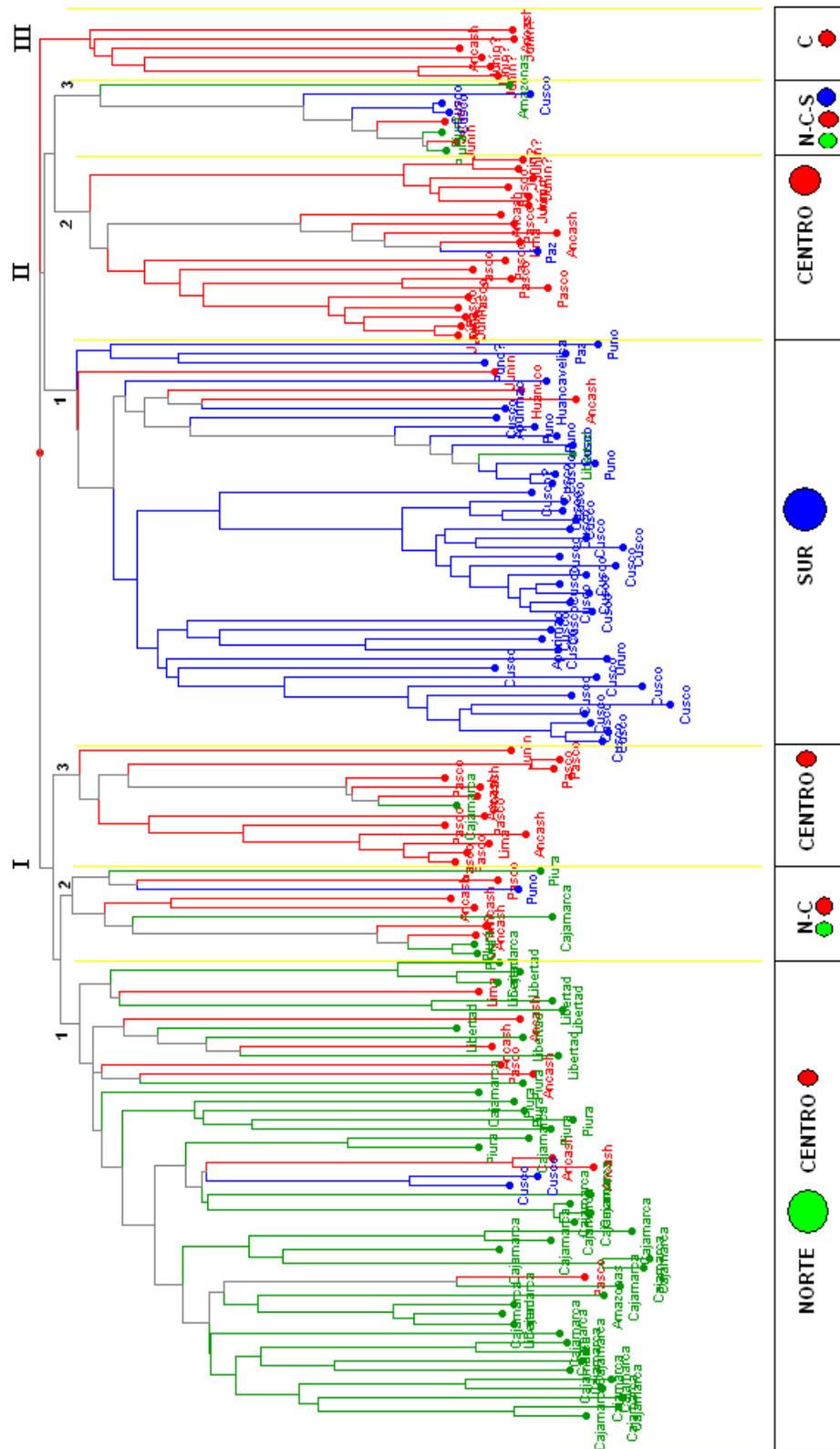
Se realizó el AMOVA a las 151 accesiones, con la finalidad de evaluar si existían diferencias en la diversidad genética presente entre las zonas norte, centro y sur del Perú. Se encontró una moderada diferenciación molecular entre las tres regiones evaluadas.

**Cuadro 3.** Análisis de varianza molecular de las 151 accesiones distribuidas en regiones del norte, centro y sur.

Fuente de variación	G.L.	Suma de cuadrados	Componentes de variancia	Porcentaje de variación									
Entre regiones	2	471.207	2.87279 va	10.91									
Dentro de las poblaciones	248	5819.016	23.46377 vb	89.09									
Total	250	6290.223	26.33656										
Fixation Index	FST :	0.10908 : moderadamente diferenciado											
distancia genetica entre regiones <table border="1" style="margin-left: auto; margin-right: auto;"> <thead> <tr> <th></th> <th>CENTRO</th> <th>NORTE</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <th>NORTE</th> <td style="text-align: center;">-</td> <td></td> </tr> <tr> <th>SUR</th> <td style="text-align: center;">+</td> <td style="text-align: center;">+</td> </tr> </tbody> </table>						CENTRO	NORTE	NORTE	-		SUR	+	+
	CENTRO	NORTE											
NORTE	-												
SUR	+	+											
- no significativo, + significativo													

**b. Diversidad genética de Nei (D)**

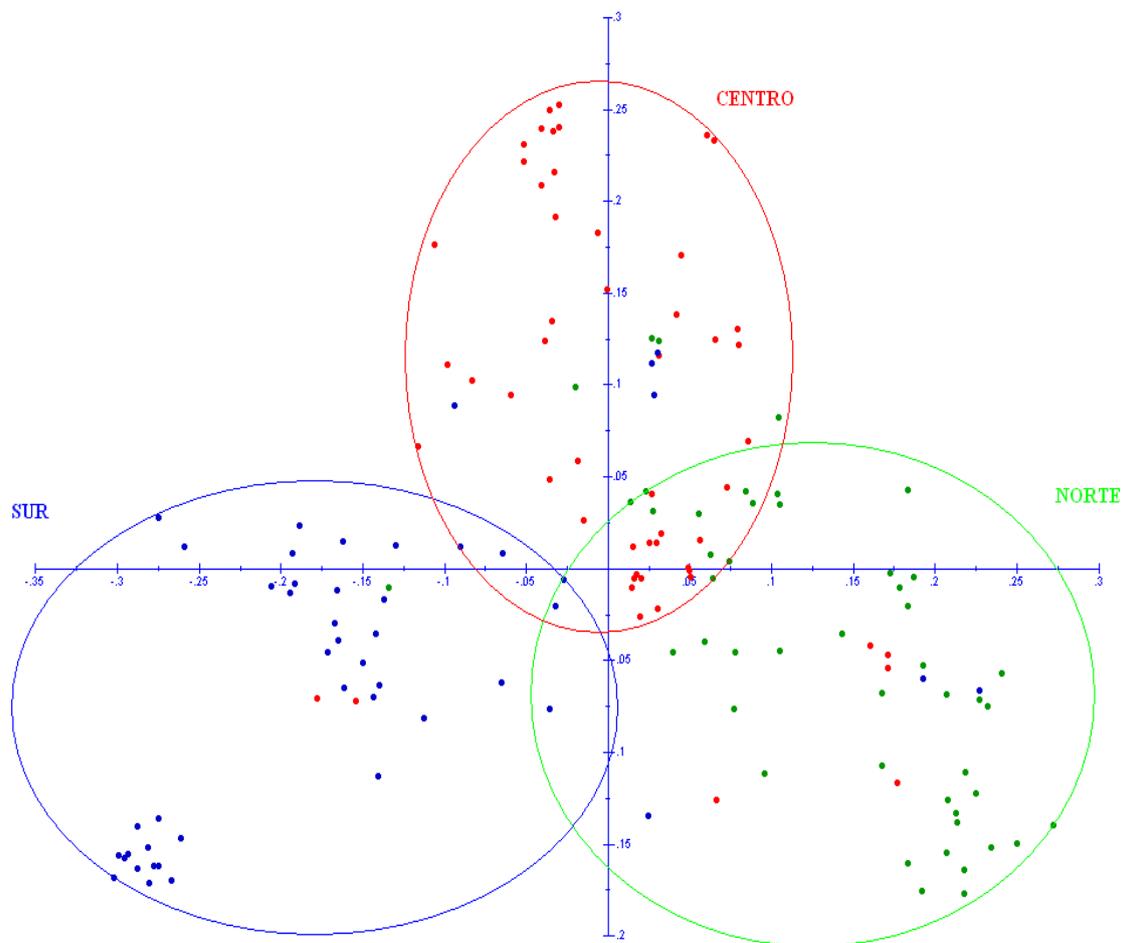
Según los datos de caracterización molecular mediante marcadores AFLP, la diversidad genética promedio de la colección de 151 accesiones analizadas es de 0.35, este valor indica una alta diversidad dentro de la colección de accesiones de olluco evaluado, muy similar a lo obtenido por Córdor (2013), el cual determina 0.32 de diversidad según Nei (D).



**Figura 6.** Dendrograma formado con las 151 accesiones usando el índice de Jaccard. A 0.47 de índice de similaridad de Jaccard se forman los grupos I (con 3 subgrupos), II (con 3 subgrupos) y III.

### c. Análisis de coordenadas principales

El análisis factorial de coordenadas principales (ACoP) permite observar la formación de posibles límites de distribución genética en relación a las regiones geográficas. Se pueden distinguir ligeramente 3 grupos en relación a las accesiones pertenecientes a departamentos ubicados en el norte, centro y sur; adicionalmente un grupo de accesiones provenientes de Bolivia se distribuyen junto con las accesiones del sur y centro del Perú (figura 7).



**Figura 7.** Análisis de coordenadas principales para la distribución genética de las accesiones según grupos geográficos. Grupo norte (verde), Grupo centro (rojo), Grupo sur (azul).

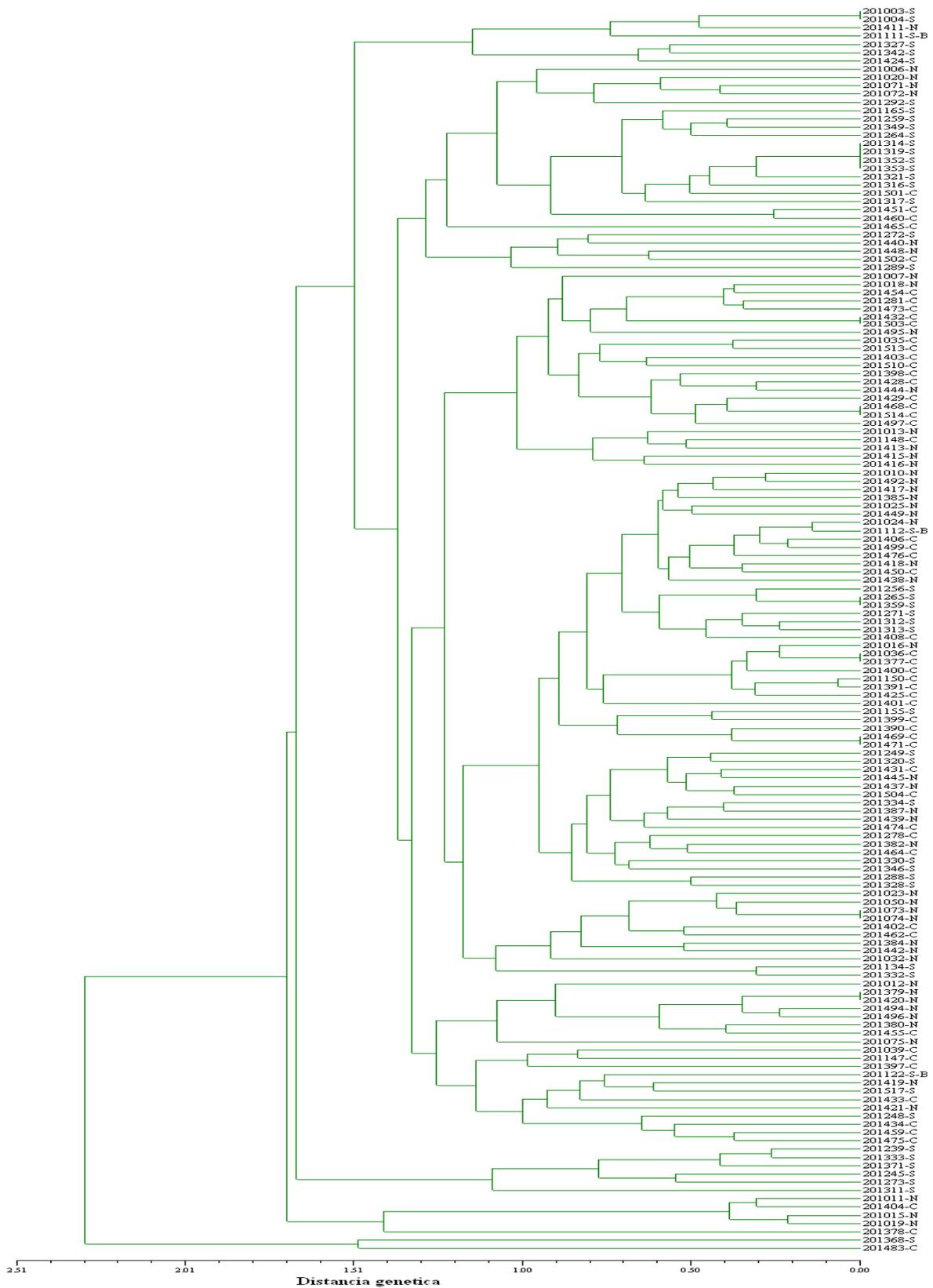
#### 4.1.6 Diversidad morfológica de olluco según descriptores IPGRI-CIP (2003)

En base a los descriptores morfológicos, se determinó la presencia de 140 morfotipos de olluco, de un total de 151 accesiones aparentemente estables genéticamente; sin embargo, es preciso indicar que entre diferentes campañas de caracterización morfológica esto varía, pudiendo presentarse mayor o menor cantidad de morfotipos.

El análisis de componentes principales permite hacer una agrupación de variables utilizando como indicador de semejanza los coeficientes de correlación de Pearson, los valores obtenidos para los 21 descriptores morfológicos se indican en el cuadro 4, donde el valor absoluto de los coeficientes de correlación con valores mayores a 0.5 indican un alto grado de discriminación. Los valores para la elongación de tallo (ET), color de follaje (CF), hábito de floración (HF) y forma de raquis (FR) tienen valores bajos en el primer, segundo, tercero e incluso en el cuarto componente. Estos adicionalmente, como ya se indicó, no son constantes entre diferentes campañas de evaluación. Para el caso de la forma de la lámina (FL) y tendencia a formar flores con más de 5 pétalos (TP), presentan valores bajos probablemente a que dentro de las accesiones evaluadas son pocas las plantas de olluco con forma distinta de lámina y tendencia a tener más de 5 pétalos, sin embargo, estos descriptores se mantienen entre diferentes campañas de evaluación.

**Cuadro 4.** Caracteres asociados a los componentes principales (CP) de 151 accesiones de olluco y sus coeficientes de correlación. Valores absolutos resaltados con azul indican alto grado de discriminación del descriptor.

DESCRIPTOR	SIGLAS	C1	C2	C3	C4
PORTE de la PLANTA	PP	0.0328	0.0722	0.6084	0.1660
ELONGACION del TALLO	ET	-0.3903	0.2638	0.2574	0.0357
COLOR de TALLOS	CT	-0.8003	-0.1111	-0.0470	-0.3665
PIGMENTACION de ARISTAS	PA	-0.6499	0.1121	0.0129	-0.1157
FORMA de LÁMINAS	FL	0.2305	-0.3752	-0.3719	0.0085
COLOR de FOLLAJES	CF	-0.3079	0.3592	0.2665	-0.1126
COLOR de ENVES	CE	-0.5368	-0.1271	-0.1846	-0.3218
COLOR de PECIOLOS	CP	-0.7198	-0.0656	-0.0132	-0.4731
HABITO de FLORACION	HF	-0.0090	-0.3458	-0.1481	-0.4540
FORMA de RAQUIS	FR	-0.3358	0.3993	0.2574	0.2896
COLOR de RAQUIS	CR	-0.7206	0.0237	0.0154	-0.3242
COLOR de SEPALOS	CS	-0.6486	-0.0978	0.2805	0.1178
COLOR de PETALOS	CT	-0.5379	-0.2630	-0.1190	0.2696
TENDENCIA de PETALOS	TP	-0.1588	0.1370	-0.2298	-0.0138
COLOR PREDOMINANTE-1	CP1	-0.6939	-0.2164	-0.3079	0.5077
COLOR SECUNDARIO-2	CS	0.0400	0.8082	-0.3712	-0.1419
DISTRIBUCION del COLOR-2	DC	0.0726	0.8373	-0.3951	-0.1245
QUIMERAS	Q	-0.1220	0.3507	-0.6367	0.2066
FORMA del TUBERCULO	FT	-0.1228	0.5173	0.2187	0.1021
COLOR de la zona CORTICAL	CC	-0.6485	-0.2560	-0.3265	0.4977
COLOR de la MEDULA	CM	-0.5139	0.3732	0.0799	0.2142



**Figura 8.** Fenograma de 151 accesiones de olluco con 21 descriptores morfológicos, en el cual se identificaron 140 morfotipos. Las accesiones tienen una letra adicional que indica la región respectiva; norte (N), centro (C), sur (S) y Bolivia (B).

Los resultados del test de asociación, para la diversidad molecular y morfológica de las 151 accesiones, indicaron una baja correlación:

Correlación de matrices:  $r = -0.20559$

(Normalizado Z estadístico mantel)

Mantel t-test aproximado:  $t = -11.2715$

Probabilidad randomizada  $Z < \text{obs. } Z$ :  $p = 0.0000$

#### 4.1.7 Identificación de Duplicados

Para la identificación de material duplicado en base a los datos de similaridad genética, realizado para las 151 accesiones de olluco evaluadas, utilizando 142 marcadores AFLP polimórficos, se registraron 147 accesiones genéticamente diferentes entre sí (genotipos únicos), y 4 accesiones genéticamente idénticas (duplicados) que forman 2 grupos con índice de similitud mayor a 0.98 y morfológicamente similares (distancia genética menor a 0.4= equivalente a 1 o 2 descriptores). Además de pertenecer al mismo departamento de colecta (Cuadro 5). La identificación de genotipos duplicados se incrementa si se considera un índice de similitud 0.95 para identificar duplicados, sin embargo fue preferible, maximiza la eficiencia de identificación de duplicados. Es necesario estudios complementarios que permitan contrastar estos resultados.

**Cuadro 5.** Grupos duplicados de accesiones según índice de similitud y distancia taxonómica.

Grupo	Nro de Accesoión	Procedencia	Índice de Jaccard	Distancia Genética
I	201320	Cusco	0.99	0.40
	201334	Cusco		
II	201428	Junín	1.00	0.35
	201429	Junín		

#### 4.2 Discusión

Las bandas obtenidas para las 6 combinaciones de iniciadores utilizados (Cuadro 1), muestran patrones de bandas muy polimórficas con un PIC mayor igual a 0.1

(contenido de información polimórfica) para cada uno de los 142 marcadores AFLPs seleccionados, con alta resolución de bandas.

De los resultados obtenidos para la evaluación de estabilidad genética de germoplasma de olluco conservado *ex situ*, mediante el uso de marcadores moleculares de AFLP y descriptores morfológicos de olluco, se observa la presencia de variabilidad genética entre el par de clones de accesiones provenientes de conservación *in vitro* y campo, y esta variación se evidencia en base al índice de similitud SM en un rango de 0.6 a 1.0 para la caracterización molecular y una distancia genética de 0 a 2.5 para la caracterización morfológica (cuadro 2). Molecularmente esto representa valores de disimilitud de 0 a 0.4 entre pares de clones, es decir existen pares de accesiones clones conservados *in vitro* y campo que difieren en un 40% de bandas polimórficas de AFLPs. La variación genética existente en frecuencias muy bajas es propia de las células; sin embargo, una variabilidad significativa puede ser debido a que las células han sido sometidas a un protocolo de cultivo de tejidos, pudiendo ser también pre-existente en las células de la planta donante como eventos de variación epigenética o se puede originar en el proceso de cultivo *in vitro*, principalmente en la fase de callo (Ringgit y Kings, 1993). Ambos podrían influir en la estabilidad genética de las plantas regeneradas, pero solo aquellas que produzcan cambios en regiones de expresión serán las que se manifiesten a nivel fenotípico.

Los resultados de variación genética obtenida en el análisis de estabilidad de olluco muestra valores reales de cambios genéticos producidos por eventos naturales o debidos a las condiciones de conservación al cual están sometidas las 236 accesiones evaluadas; cabe mencionar que estudios relacionados al análisis de la estabilidad genética como el de Angel *et al.* (1996), determinaron mediante un análisis molecular, la estabilidad genética de entradas de yuca (*Manihot esculenta* Crantz) mantenidas *in vitro* en el CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical), utilizando marcadores moleculares de RFLP y RAPD (polimorfismo en el ADN amplificado al azar), donde no detectaron variación a nivel del ADN después de 10 años de mantenimiento *in vitro*; sin embargo, recomiendan en este estudio la necesidad de utilizar otro tipo de marcador molecular y aumentar el número de variedades mantenidas por 10 o más años.

Estudios recientes y el presente confirman la eficiencia de los AFLP, en la determinación adecuada de estabilidad genética en plantas (Vargas *et al.*, 2002; Legesse

*et al.*, 2007; Sorkheh *et al.*, 2007; Perera *et al.*, 2010; González, 2001), frente a otros estudios donde evaluaron plantas de papa derivadas de cultivo *in vitro*, y no encontraron variaciones en el patrón de bandas de RFLP, pero si algunas variaciones en el patrón de bandas de RAPD (Mandolino *et al.*, 2007; Chimot *et al.*, 2007).

La variación genética significativa (mayor a 0.05 de disimilitud) registrada en 59 accesiones pares de clones de *in vitro* y campo, manifiestan la posible ocurrencia de pérdida de estabilidad genética con datos moleculares en 20 accesiones equivalentes a un 8.5 % del total de accesiones analizadas (236 accesiones), y una posible ocurrencia de pérdida de identidad en 39 accesiones equivalentes a un 16.5% del total de accesiones analizadas (según, cuadro 2). El trabajo realizado por Castillo *et al.* (2010), donde determinaron que no se mantiene la estabilidad genética de las accesiones estudiadas en medios de conservación que contienen manitol, por tanto, sugieren la utilización de nuevos retardadores del crecimiento, como el sorbitol y acimidol, que se han empleado con éxito en la conservación a mediano plazo del germoplasma de papa a nivel mundial; además, se informa que explantes provenientes de cultivo de callos son generalmente más susceptibles de producir variantes somaclonales (Larkin y Scowcroft, 1981; Villalobos *et al.*, 1991). Esta hipótesis la sostienen muchos autores (Hanna *et al.*, 1984, Armstrong *et al.*, 1985 citados por Gupta y Varshney, 1999). Sin embargo, la causa exacta de la variación somaclonal en cultivos *in vitro* es aún desconocida, pero sugieren una serie de factores, que en conjunto o por separado son los responsables (Modgil *et al.*, 2005).

Mediante el uso de AFLPs en *Bordean vulgares* (cebada) se ha evaluado la estabilidad genética en plantas derivadas por androgénesis y embriogénesis somática, y se encontró un promedio del 6% de variación somaclonal (Vendare *et al.*, 2007); en *Papaver bracteatum* (adormidera de Siberia) se evaluó la estabilidad genética en plantas regeneradas a partir de callos, y no se detectó variación somaclonal determinándose que las plantas eran híbridas (Carolan *et al.*, 2002); en *Actinidia deliciosa* (kiwi) se evaluó la variación genética en plantas regeneradas a partir de callos provenientes de hojas o tallo, observándose cierta variación entre clones en índice de similitud de 73-90% (Prado *et al.*, 2007); Etienne *et al.* (2002), en *Coffea arabica* y *C. canephora* (café) evaluó la variación somaclonal en embriones somáticos de híbridos mejorados, dependiendo del genotipo, se registró entre 3% y 10% de variación somaclonal. Para el presente estudio se consideró 5% (disimilitud = 0.05) de variación genética no significativa en base a los

estudios referidos, permitiendo atribuir esta variación a errores de evaluación o cambios de baja frecuencia que ocurren de forma natural, o cambios con poca probabilidad de afectar la identidad original (Figura 5 y cuadro 2). Adicionalmente, en la presente investigación se sustenta la consideración del índice de similitud con valor 0.95 (0.05 de disimilitud) mediante una prueba de análisis de varianza molecular (AMOVA) entre las muestras conservadas *in vitro* y en campo, obteniendo un valor de  $F_{st} \approx 0.0$ , lo que indica la falta de diferenciación molecular significativa entre la población de muestras conservadas *in vitro* y su población de clones conservados en campo, esta validación también lo reporta Morata *et al.*, 2005. Si se realiza un AMOVA considerando accesiones *in vitro* y campo con índices de disimilitud mayor a 0.05 sucede que se obtiene una moderada diferenciación molecular ( $F_{st} = 0.05-0.15$ ).

En base a los resultados obtenidos, es preciso señalar que los cambios no siguen un patrón constante en relación con el tiempo de conservación, sino que son en cierta medida al azar, con una mayor probabilidad de presencia con relación al tiempo de conservación *in vitro*, ya que en nuestro estudio se registran accesiones, como por ejemplo la accesión 201074 con 19 años de conservación *in vitro* (ANEXO 2), y sin embargo mantienen su estabilidad genotípica al 100% según los marcadores AFLP utilizados y morfológicamente mantienen su fenotipo. Así también, existen accesiones con 3 años de conservación *in vitro* (ANEXO 2) que presentan variación genética de hasta un 40% según AFLP, como es el caso de las accesiones 201430 y 201446, lo que podría estar indicando la pérdida de identidad genotípica, sin embargo no necesariamente se presentan cambios a nivel fenotípico, ya que la información genética afectada puede no estar relacionado a los descriptores morfológicos si no a otros caracteres que podrían ser de interés agronómico.

La verificación de identidad obtenida para las 151 accesiones de las 236 accesiones evaluadas, se relacionan al estudio realizado por Perazzo (2001), quien evaluó la estabilidad genética de accesiones de papa conservadas *in vitro*; utilizando marcadores moleculares microsatélites SSR y morfológicos, donde indicó la estabilidad genética de plantas constantemente micropropagadas *in vitro* en comparación con sus clones, sin embargo indico la existencias de 20 genotipos no bien identificados y atribuye las pocas diferencias a la presencia de patógenos o factores ambientales. Adicionalmente, mostró que pérdidas de identidad genética de accesiones del banco de germoplasma son causadas por mezclas mecánicas o mala identificación debido

mayormente a errores humanos, que las causadas por los protocolos de conservación *in vitro* utilizados principalmente en bancos de germoplasma que mantienen grandes colecciones; por otro lado, afirma que la complementación de los descriptores morfológicos y moleculares confirman que los métodos de conservación *in vitro*, mantienen la estabilidad genética del germoplasma conservado; cabe resaltar que estos resultados no se reflejan en el presente estudio para olluco, donde a partir de accesiones consideradas genótipicamente estables al 0.95 de similitud SM entre el par de clones *in vitro* y campo, se determinó que sólo 151 accesiones verifican su identidad en contraste con descriptores morfológicos discriminantes y estables (cuadro 2). Por lo mencionado, es preciso señalar que algunos descriptores morfológicos de olluco no son estables y estos deberían ser replanteados en su perfil de registro o reemplazarlos por otros con una alta estabilidad entre periodos de evaluación; ejemplos de estos descriptores variables, son la elongación de la planta que varía según el estado de desarrollo, el color de follaje que puede estar influenciado por la presencia de patógenos o variación de la cantidad de irradiación solar al momento de evaluar, el hábito de floración que es variable según el estado de madurez de la planta, y la forma del raquis que depende del grado de desarrollo y tamaño de la planta además de estar posiblemente influenciado por su exposición directa o no hacia la radiación solar lo que hace más o menos notorio el zig-zag considerado para este descriptor. En muchos casos estas variaciones limitaron una exhaustiva evaluación. Frente a esto, es una necesidad realizar un registro periódico y continuo para la identificación de descriptores morfológicos altamente estables, y es muy probable la reformulación de algunos o simplemente el establecimiento de otro descriptor más estable y no consideración de alguno de estos 4 descriptores mencionados. La consideración actual de los descriptores mencionados quizás sea responsable de la baja correlación obtenida ( $r = -0.23198$ ) para las matrices de similitud morfológica - molecular.

La presente evaluación de estabilidad genética usando marcadores moleculares AFLP y descriptores morfológicos para un grupo de muestras grande (como son las 236 accesiones de olluco), permitió realizar una verificación de identidad y adicionalmente hacer un análisis de diversidad genética e identificación de duplicados; como el trabajo realizado en ajo donde se evaluó el grado de diversidad genética e identificar duplicados de accesiones mediante el análisis de similitud (Vieira y Nodari, 2007). Adicionalmente, Ipek *et al.*, 2003 y Volk *et al.* (2004), señalan que los AFLPs han sido útiles para

diferenciar clones de ajos que no habían podido ser individualizados con RAPD e isoenzimas.

El análisis de diversidad genética según los datos de caracterización molecular mediante AFLP se realizó usando el índice de similitud Jaccard que considera la presencia de atributos entre OTUs permitiendo evaluar el grado de diferenciación entre OTUs (accesiones) y que la presencia de estas podrían significar la expresión de ciertas características que se encuentran de manera exclusiva en un departamento o región geográfica, y no considerar atributos ausentes ya que no brindan información de riqueza génica (Figura 6). La diversidad genética promedio de la colección de 151 accesiones (con estabilidad genética) es de 0.35, siendo este un indicador de una alta diversidad genética dentro de la colección de accesiones de olluco evaluado. Similar a lo reportado por Córdor (2013), quien determina 0.32 de diversidad según Nei (D).

La distribución genética de las 151 accesiones según los agrupamientos en el dendograma y el análisis factorial de coordenadas principales (ACoP) demostró la formación de posibles límites de distribución genética relacionados con las regiones geográficas (Figura 7), esto permite distinguir 3 grupos de accesiones pertenecientes a departamentos ubicados en el norte, centro y sur del Perú, y muestra claramente que las accesiones provenientes de Bolivia están distribuidas dentro de accesiones pertenecientes al sur y centro del Perú (Figuras 6 y 7). El análisis de varianza molecular (AMOVA) indica que las regiones norte centro y sur presentan una moderada diferenciación molecular entre poblaciones ( $F_{st} = 0.10908$ ) (Cuadro 3).

La identificación de accesiones con genotipos duplicados es un aporte del presente estudio que permite indicar, con un índice de similitud de Jaccard mayor a 0.98 y una distancia genética morfológica menor a 0.4, la presencia de 147 accesiones con genotipos únicos y 4 accesiones duplicados (Cuadro 5). La consideración de un valor de similitud igual a 0.95, mostraría la existencia de un mayor número de duplicados, sin embargo, este caso deberá ser evaluado posteriormente mediante el uso justificado de otros marcadores moleculares y su correspondencia morfológica.

En la revisión bibliográfica realizada no se encontraron referencias sobre el estudio de la estabilidad genética de olluco con el uso de AFLP, lo que sugiere la realización de estudios posteriores que amplíen estos conocimientos tomando como punto de partida toda la información generada en esta investigación.

## V. CONCLUSIONES

La presente investigación reveló que 151 accesiones de olluco presentan estabilidad genotípica según AFLP y fenotípica según descriptores morfológicos; considerando un índice de similitud SM (según marcadores moleculares AFLP) mayor a 0.95 y un índice de similitud morfológica menor a 0.8 (distancia genética según descriptores morfológicos de olluco).

La pérdida de identidad genotípica, no necesariamente se expresa como un cambio a nivel fenotípico, ya que la información genética afectada puede no estar relacionado a los descriptores morfológicos si no a otros caracteres, que podrían ser de interés agronómico.

La presencia de variación genética a nivel de marcadores moleculares AFLP, se observó incluso en accesiones con características morfológicas idénticas. Estos podrían ser pequeñas variaciones somaclonales que no afectan a los descriptores morfológicos utilizados pero si al patrón de bandas de AFLPs obtenidos para las accesiones de olluco evaluados.

Los cambios genéticos en accesiones conservadas *in vitro* no siguen un patrón constante de variación genética según el tiempo de conservación, todo indica que son al azar bajo condiciones *in vitro*, y muy probablemente dependientes también del genotipo.

La verificación de identidad de las 151 accesiones consideradas estables genotípicamente se corresponde con su caracterización morfológica entre pares de clones.

La diversidad genética obtenida usando marcadores moleculares AFLP muestra un patrón de distribución genética amplia y relacionada a su distribución geográfica.

El índice de diversidad genética de Nei con valor de 0.35 indica que las 151 accesiones de olluco analizadas presentan una alta diversidad genética.

La determinación de duplicados con un índice de Jaccard 0.98 establece la presencia de 4 accesiones de genotipos duplicados que se corresponden morfológica y espacialmente.

## **VI. RECOMENDACIONES**

Replantear algunos descriptores morfológicos no estables o establecer un criterio para determinar un verdadero valor de estos, como son la elongación de la planta, estado de floración, color de follaje y tipo de arista.

Incrementar el número de marcadores moleculares AFLP, o complementar los resultados con otros marcadores moleculares para confirmar los resultados.

Para confirmar los resultados inesperados es necesario completar la evaluación de estabilidad genética del total de accesiones pertenecientes al banco de germoplasma del CIP y reevaluar las 82 consideradas inestables genéticamente en este estudio.

En el manejo de germoplasma, establecer el monitoreo de identidad desde el ingreso del material al banco hasta su distribución, es decir, realizar evaluaciones periódicas de estabilidad a fin de prevenir posibles cambios en el material conservado.

## VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- **Acosta-Solís, M. 1980.** Tubérculos, raíces y rizomas cultivados en el Ecuador. En: II Congreso Internacional de Cultivos Andinos. Riobamba, Ecuador. Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas, OEA. p. 175-214.
- **Al-Zahim, M; For-Lloyd, B; Newbury, H. 1999.** Detection of somaclonal variation in garlic (*Allium sativum* L.) using RAPD and cytological analysis. Plant Cell Reports. 18:473-477.
- **Alfaro, M; Zoller, S y Lutzoni, F. 2003.** Bayes or “bootstrap”? A Simulation Study comparing the performance of Bayesian Markov Chain Monte Carlo Sampling and “bootstrapping” in assessing Phylogenetic Confidence. Mol. Biol. Evol., 20(2):255- 266.
- **Angel, F; Barney, V; Tohme, J; Roca, W. 1996.** Stability of cassava plants at the DNA level after retrieval from 10 years of in vitro storage. *Euphytica* 90 (3): 307-313.
- **Arbizu, C. 2004.** Clasificación y morfología (Capítulo 2). pp. 5-11 En: G. López & M. Hermann (eds). El cultivo del Ulluco en la Sierra Central del Perú. Serie: Conservación y uso de la biodiversidad de raíces y tubérculos andinos. Una década de investigación para el desarrollo (1993-2003). N°. 3. Centro Internacional de la Papa, Universidad Nacional del Centro, Instituto Vida en los Andes, Universidad Nacional Agraria La Molina, Agencia Suiza para el desarrollo y la cooperación, Lima, Perú. P. 5-11.
- **Atteson, K. 1997.** The performance of neighbor-joining algorithms of phylogeny reconstruction. pp. 101–110. In Jiang, T., and Lee, D., eds., Lecture Notes in Computer Science, 1276, Springer-Verlag, Berlin. COCOON '97.
- **Avalos, C. 2008.** Olluco: Sabrosa raíz andina. Revista Generación, Lima – Perú. Volumen 78: 42 – 47.
- **Barrera, V; Espinoza P; Tapia, C; Monteros, A; Valverde, F. 2004.** Caracterización de las raíces y los tubérculos andinos en la ecoregión andina del Ecuador (Capítulo 1). En: V. Barrera; C, tapia y A, Monteros (eds.). Raíces y

Tubérculos Andinos: Alternativas para la Conservación y uso sostenible en el Ecuador. Serie: Conservación y uso de la biodiversidad de raíces y tubérculos andinos. Una década de investigación para el desarrollo (1993-2003). N° 4. Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias, Centro Internacional de la Papa, Agencia Suiza para el Desarrollo y la Cooperación. Quito, Ecuador - Lima, Perú. p. 3-30.

- **Bednarek, PT; Orłowska, R; Koebner, RMD; Zimny, J. 2007.** Quantification of the tissue-culture induced variation in barley (*Hordeum vulgare* L.). *BMCPlant Biology* 7: 10.
- **Börner, A; Chebotar, S; Korzun V. 2000.** Molecular characterization of the genetic integrity of wheat (*triticum aestivum* L.) germplasm after long-term maintenance. *Theoretical Apply Genetic* 100: 494-497.
- **Brown, P. 1989.** DNA methylation in plants and its role in tissue cultura. *Genome* 31:717: 729.
- **Brown, P; Gobel, E; Lorz, H. 1991.** RFLP analysis of *Zea mays* callus cultures and their regenerated plants. *Theoretical Apply Genetic* 81: 227-232.
- **Brücher, H. 1967.** *Ullucus aborigineus* spec. nov., die Wildform einer andinen Kulturpflanze. *Ber Deutsch. Bot. Ges.* 80(4): 376-381.
- **Brücher, H. 1989.** Useful plants of neotropical origin and their wild relatives. Springer Verlag, Berlin. p. 46-53.
- **Bukasov, SM. 1985.** Las plantas cultivadas de México, Guatemala y Colombia. En: Tapia, M. (ed.), *Avances en las Investigaciones Sobre Tubérculos Alimenticios de los Andes.* (PISCA IICA/CIID), p. 33-40, (Traducción del ruso).
- **Cadima, X., G. Valdivia, V. Guzmán. 1997.** Caracterización morfológica y bioquímica (pruebas preliminares). En: Informe anual 1996-97 IBTA PROINPA. Cochabamba, Bolivia. Pp. 934-936.
- **Calva, CG; Ríos, LE. 1999.** Cultivo de callos y su acumulación de metabolitos secundarios. In: *Aspectos Aplicados de la Biotecnología* (Rodríguez V. R., Calva C. G., Salazar M. A., Ramos R. E. G. Eds.) pp. 267-301 Cap. 6. Coedición SEP-IPN.
- **Cárdenas, M. 1969.** Manual de plantas económicas de Bolivia. Cochabamba, Imprenta Icthus, p. 54-60.
- **Cardenas, M. 1989.** Manual de plantas económicas de Bolivia. Enciclopedia Boliviana 2ed. Editorial Los Amigos del Libro. Cochabamba, Bolivia.

- **Carolan, J; Hook, I; Walsh, J; Hodkinson, T. 2002.** Using AFLP markers for species differentiation and assessment of genetic variability of in vitro–cultured *Papaver bracteatum* (Section *Oxytona*). *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant* 38: 300–307.
- **Castillo, JG; Estévez, A; Salomón, JL; Vargas, D; Hernández, MM; Pérez, A; Borrás-Hidalgo, O; López, Y; Arencibia AD. 2010.** Determinación de la estabilidad genética en cuatro especies del banco de germoplasma de papa en cuba conservadas *in vitro*. *Cultivos Tropicales*, 2010, vol. 31, no. 3, p. 51-57.
- **Chimot, VP; Swarup, KC; Pattanayak, D. 2007.** Molecular analysis of cytoplasm type in Indian potato varieties. *Euphytica*, 2007, vol. 162, no. 1, p. 69-80.
- **CIP (CENTRO INTERNACIONAL DE LA PAPA, PE). 1997.** Molecular Biology Laboratory Protocols: Plant Genotyping. Ghislain, M; Zhang, D y Herrera, R (Eds.). Genetic Resources Department, training manual, CIP, Lima, Perú.
- **Clark, C; Moyer, J. 1988.** Compendium of sweet potato diseases. Minnesota (USA). *The american phytopathological society*. (6) 74 p.
- **Cortés, BH. 1985.** Alcances de la investigación en tres tubérculos andinos: Oca (*Oxalis tuberosa*), olluco (*Ullucus tuberosus*), mashua o isaño (*Tropaeolum tuberosum*). En: M.E. Tapia (ed.), *Avances en las investigaciones sobre tubérculos alimenticios de los Andes*. (PISCA IICA/CIID). p. 62-83.
- **Crisci, JV; Lopez, MF. 1983.** Introducción a la teoría práctica de la taxonomía numérica. Secretaria de la Organización de estados americanos (OEA). Washington, DC. P 39-67.
- **Darlington, CD; Wylie, AP. 1955.** Chromosome atlas of flowering plants, George Allen & Unwin LTD, London. p. 87.
- **Dávila, J; Loarce, Y; Ramsay, L; Waugh, R; Ferrer, E. 1999.** Comparison of RAMP and SLR markers for the study of wild barley genetic diversity. *Hereditas*, 131:5-13. Suecia.
- **D’amato, F. 1975.** The problem of genetic stability in plant tissue and cell cultura. P. 333-348. O. H. Frankel and J.G. Hawkes (eds). *Crop genetic resources for today and tomorrow*. Cambridge University Press, Cambridge, U.K.
- **Delgado, M. 1999.** “Determinación de niveles de ploidía en olluco (*Ullucus tuberosus* Loz)”. Tesis. FCB – UNSAAC.

- **Dice, LR. 1945.** Measurement of the amount of ecological association between species. *Ecology*, 26:297-302.
- **Doyle, JJ; Doyle, JL. 1990.** A rapid total DNA preparation procedure for fresh plant tissue. *Focus* 12:13-15.
- **Dunn, G; Everitt, BS. 1982.** Dover reprint 2004. *An Introduction to Mathematical Taxonomy*. Cambridge: Cambridge University Press.
- **Efron, B. 1979.** "Bootstrap Methods: Another Look at the Jackknife". *The Annals of Statistics* 7 (1): 1–26. doi:10.1214/aos/1176344552.
- **Elfron, B; Halloran, E y Holmes, S. 1996.** "Bootstrap" confidence levels for phylogenetic trees. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 93: 7085-7090.
- **Engelmann, F. 1997.** Importance of desiccation for the cryopreservation of recalcitrant seed and vegetatively propagated species. *Plant Genetic Resources Newsletter* 112: 9-18.
- **Engelmann, F. 2002.** Technologies and Strategies for *ex situ* Conservation. In: Engels, J.M.M., Ramanatha Rao, V., Brown, A.H.D, Jackson, M.T. (Eds.), *Managing Plant Genetic Diversity*, pp. 89-103. IPGRI. Rome, Italy.
- **Engelmann, F. 2004.** Plant Cryopreservation: progress and prospects. In *Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant* 40: 427-433.
- **Espín, S; Villacrés, E; Brito, B. 2004.** Caracterización físico - química, nutricional y funcional de raíces y tubérculos andinos (Capítulo IV). En *Raíces y tubérculos andinos: alternativas para la conservación y uso sostenible en el Ecuador*. (pp. 91-116). N° 4. Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias - Centro Internacional de la Papa - Agencia Suiza para el Desarrollo y la Cooperación. Quito, Ecuador - Lima, Perú.
- **Etienne, H; Dussert, S; Fernandez, D; Lashermes, P; Bertrand, B. 2002.** Biotechnological applications for the improvement of coffee (*Coffea arabica* L.). In *Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant* 38: 129-138.
- **Excoffier, L; Smouse PE ; Quattro, JM. 1992.** Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, 131:479-491.
- **Felsenstein, J .1985.** Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783-791.

- **Gandarillas S.C.H; Luizaga, J. 1967.** Número de cromosomas de la papalisa (*Ullucus tuberosus* Caldas). Sayaña, Revista Bolivariana de Agricultura 5(2): 8-9.
- **Gen- Lou, S; Díaz, O; Salomon, B; Bothmer, R. 1999.** Genetic diversity in *Elymus caninus* as revealed by isozyme, RAPD, and microsatellite markers. Genome/Génome 42(3): 420-431.
- **González, G. 2001.** Embriogénesis somática en henequén (*Agave fourcroydes* Lem.). 114 p. Tesis (en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Agrícolas).
- **Gonzalez-Arno, M.T., Engelmann, F. 2006.** Cryopreservation of plant germplasm using the encapsulation - dehydration technique: review and case study on sugarcane. *Cryo-Letters* 27 (3): 155-168.
- **Gopal, J. 1999.** *In vitro* versus *in vivo* genetic divergence in potato. Theoretical Apply Genetic. 98:299-304.
- **Goto, S; Thakur, R; Ishii, K. 1998.** Determination of genetic stability in long-term micropropagated shoots of *Pinus thunbergii* Parl. Using RAPD markers. Plant Cell Report 18: 193-197.
- **Gower, J. 1971.** A general coefficient of similarity and some of its properties. Biometrics, 27:857-874.
- **Grau, A; Rea, J. 1997.** Yacón, *Smallanthus sonchifolius* (Poepp. & Endl) H. Robinson. Pp 199-242. En: **Hermann, M y Heller, J. 1997.** *Andean Roots and tubers: Ahipa, Arracacha, Maca and Yacon.* Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops. 21. Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, Gatersleben/ International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy.
- **Gross, R; Koch, F; Malaga, I; de Miranda, AF; Schoeneberger, H; Trugo, LC. 1989.** Chemical composition and protein quality of some local andean food sources. Food Chemistry 34: 25-34.
- **Gupta, P; Varshney, R. 1999.** Molecular markers for genetic fidelity during micropropagation? Current Science 76: 1308-1310.
- **Gutiérrez, LG. 2002.** “Embriogénesis somática en *Alnus acuminata* H.B.K y estudio de la variación somaclonal mediante marcadores moleculares”, Tesis Doctoral, Universidad Politécnica de Valencia, España, 2002.
- **Gutiérrez, LG. 2004.** Marcadores moleculares AFLP de plantas donadoras de aliso *Alnus acuminata* H.B.K., *Revista Scientia et Técnica* 25, Universidad Tecnológica de Pereira.

- **Hair, J; Anderson, R; Tatham, R y Black, W. 1992.** Multivariate Data Analysis. MacMillon Publ. Co. New York. 544p.
- **Harding, K. 1994.** Molecular stability of the ribosomal RNA gene in *Solanum tuberosum* plants recovered from slow growth and cryopreservation. *Euphytica* 55:141-146.
- **Hartl D., Clark A. 1997.** Principles of population genetics. Third Edition. Sinauer Associates, Inc. Canada. Pags.: 111-119.
- **Hernández, B.J.E; León, J. 1992.** Cultivos marginales: otra perspectiva de 1492. En: Producción y protección vegetal No. 26. FAO. Roma, Italia.
- **Hernandez, T; Miller, J. 1964.** Frecuency of somatic mutations in several sweet potato varieties. *Proceedings of the american society for horticultural science.* 85:430-433.
- **Highton, R. 1993.** The relationship between the number of loci and the statistical support for the topology of UPGMA trees obtained from genetic distance data. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 2:337-343.
- **Hillis, DM; Bull, JJ. 1993.** An empirical test of bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogenetic analysis. *Systematic Biology* 42:182-192.
- **Howard, HW. 1961.** Mericlinal chimeras in the potato variety Gladstone. *The new Phytologist*, 60, 388-392.
- **Ipek, M; Ipek, A; Simon, P. 2003.** Comparison of AFLPs, RAPD markers, and isozymes for diversity assessment of garlic and detection of putative duplicates in germplasm collections. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 128:246-252.
- **IPGRI/CIP, 2003.** Descriptores del Ulluco (*Ullucus tuberosus*). Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos, Roma, Italia; Centro Internacional de la Papa, Lima Perú.
- **Jaccard, P. 1908.** Nouvelles recherches sur la distribution florale. *Bull. Soc. Vaud. Sci. Nat.*, 44:223-270.
- **Kaeppler, S; Philips, R. 1993.** DNA methylation and tissue cultura- induced variation in plants. *In vitro Cell Development Biology* 29P. 125 – 130.
- **Karp, A; Bright, S. 1985.** On the causes of Origins of Somaclonal Variation (Oxford Surveys of Plant Molecular and Cell Biology, Vol. 2), Oxford University Press, pp. 199-234.

- **Kaufman, L; Rosseeuw, P. 1990.** Finding Groups in Data. An introduction to cluster analysis. A Wiley – Interscience publication. John Wiley & sons, Inc. New York. United States. 342p.
- **King, SR; Gershoff, S. 1986.** Evaluación Nutritiva de tres Tubérculos Andinos. Anales del V Congreso Internacional de Sistemas Agropecuario Andinos. Puno Perú.
- **King, SR; Gershoff, SN. 1987.** Nutritional evaluation of three underexploited Andean tubers: *Oxalis tuberosa* (Oxalidaceae), *Ullucus tuberosus* (Basellaceae), and *Tropaeolum tuberosum* (Tropaeolaceae). Economic Bot. 41(4): 503-511.
- **King, SR. 1988.** Economic Botany of the Andean Tuber Crop Complex: *Lepidium Meyenii*, *Oxalis tuberosa*, *Tropaeolum Tuberosum* and *Ullucus tuberosus*. Ph. D. Thesis, The City University, New York, 282 p.
- **Kumar, M; Barker, R; Reed, B. 1999.** Morphological and molecular analysis of genetic stability in micropropagated *Fragaria x ananassa* cv. pocahontas. In vitro cell Dev. Plant. 35 (3) 254-258.
- **Landsmann, J; Uhrig, H. 1985.** Somaclonal variation in *Solanum tuberosum* detected at the molecular level. Theoretical Apply Genetic 71:500-505.
- **Lara, JP. 2005.** “Obtención de la huella genética de agaves mezcaleros de San Luis Potosí por RAPD y AFLP”. Tesis de Maestría, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C, México, 2005.
- **Larkin, P; Scowcroft, W. 1981.** Somaclonal variation. A novel source of variability from cell cultures for plant improvement. *Theoretical and applied genetics*. 60(4):197-214.
- **Larkka, J. 1991.** Citogenética. En: L. Pietilä y M. Tapia (eds). 1991. Investigaciones sobre ulluku. Turku, Finlandia, p. 10-13.
- **Larkka, J; Jokela, P; Pietilä, L; Viinikka, Y. 1992.** Karyotypes and meiosis of cultivated and wild ulluco. *Caryologia* Vol. 45, n. 3-4: 229-235.
- **León, J. 1964.** Plantas alimenticias andinas. Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas, Zona Andina, Lima, Perú. 112 p.
- **León, J. 1994.** Los recursos fitogenéticos del Nuevo Mundo. En: J.E. Hernández y J. León (eds.) Cultivos marginados: Otra perspectiva de 1492. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Jardín Botánico de Córdoba. España. p. 3-22.

- **Legesse, BW; Myburg, AA; Pixley, KV; Twumasi-Afriyie, S; Botha, AM. 2007.** Relationship between hybrid performance and AFLP based genetic distance in highland maize inbred lines. *Euphytica*, 2007, vol. 162, no. 3, p. 313-323.
- **Lescano, JL. 1985.** Investigación en tubérculos andinos en la Universidad Nacional del Altiplano, Puno, Perú. En: M. Tapia (ed.), Agricultura Andina. Avances en las investigaciones sobre tubérculos alimenticios de los Andes. (PISCA IICA/CIID), p. 84-104.
- **Lescano, J. L. 1994.** Genética y mejoramiento de cultivos altoandinos. Programa interinstitucional de Waru Waru. Proyecto Especial Binacional. Convenio INADE/PELT COTESU. La Paz, Bolivia.
- **Li, W-H L; Graur, D. 1991.** Fundamentals of Molecular evolution. Sinauer Associates, Inc. Massachusetts. Pp. 106-08.
- **Lopez, J; Hidalgo, M. 1994.** Análisis de Componentes principales y análisis factorial. En: Ato M y Lopez J (eds). Fundamentos de estadística con SYSTAD. Addison. Wesley Iberoamericana. P 457-503.
- **Malice, M. 2009.** Genetic diversity and structure of three Andean tubers: *Oxalis tuberosa* Molina, *Ullucus tuberosus* Caldas and *Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pav. (Ph.D. Thesis). Belgium, Gembloux Agricultural University, 185 p.
- **Mandolino, G; De Marco, S; Faeti, V; Bagatta, M; Carboni, A; Ranalli, P. 2007.** Stability of fingerprints of *Solanum tuberosum* plants derived from conventional tubers and vitrotubers. *Plant Breeding*, 2007, vol. 115, no. 6, p. 439-444.
- **Mantel, N. 1967.** The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research*, 27, 209–220.
- **Mantel, N; Valand, RS. 1970.** A technique of nonparametric multivariate analysis. *Biometrics* 26: 547-558.
- **Martins, M; Sarmiento, D; Oliveira, MM. 2004.** Estabilidad genética de plántulas micropropagadas de almendras según la evaluación de marcadores RAPD e ISSR. *Plant Cell Reports*, diciembre de 2004, vol. 23, no. 7, p. 492-496.
- **Mc Gregor, CE; Lambert, CA; Greyling, MM; Louw, JH; Warnich, L. 2000.** A comparative assessment of DNA fingerprinting techniques (RAPD, ISSR, AFLP and SSR) in tetraploid potato (*Solanum tuberosum* L.) germplasm. *Euphytica* 113:135-144.

- **Medina, C; García, I; Caro, M; Aristizábal, FA. 2007.** Análisis AFLP de variación somaclonal en embriones somáticos de *Hevea brasiliensis*. *Rev. Col. Cienc. Quím. Farm.* Vol. 36 (1), 70-80, 2007.
- **Méndez, M. L. 1995.** Determinación de la ploidía del ulluco (*Ullucus tuberosus* Caldas). Tesis Ingeniero Agrónomo, Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima, Perú. 79 p.
- **Miller, J. 1935.** Further studies of mutations of the Porto Rico sweet potato. *Proceeding of American Society for Horticultural Science.* 33: 460-465.
- **Missouri Botanical Garden, 2008.** “Trópicos”. [www.tropicos.org](http://www.tropicos.org) , Saint Louis, Missouri - EEUU.
- **Modgil, M; Mahajan, K; Chakrabarti, SK; Sharma, DR y Sobti, RC. 2005.** El análisis molecular de la estabilidad genética en portainjertos MM106 micropropagadas de manzana. *Scientia Horticulturae*, marzo de 2005, vol. 104, no. 2, p. 151-160.
- **Morata B., Nebauer S., Arrillaga I., Segura J. 2005.** Assessments of somaclonal variation in micropropagated shoots of Cedrus: consequences of axillary bud breaking. *Tree Genetics and Genomes.* Volume 1, Issue 1, pp 3-10
- **Mueller, E; Brown, P; Hartke, S; Lorz, H. 1990.** DNA variation in tissue cultura deriver rice plants. *Theoretical apply genetic* 80:673-679.
- **Murashigue, T; Skoog, F. 1962.** A revised médium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. *Physiology Plant.* 15:473-497.
- **National Research Council. 1989.** Lost Crops of the Incas: Little-Known Plants of the Andes with Promise for Worldwide Cultivation. National Academy Press. Washington D.C., USA. p.106.
- **Nei, M. 1973.** Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA,* 70 (12): 3321-3323.
- **Nei, M; Li, W-H. 1979.** Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences,* USA 76: 5269-5273.
- **Ozeki, Y; Davies, E; Takeda, J. 1997.** Somatic variation during long term subculturing of plant cells caused by insertion of a transposable element in a pheynilalanine ammonia-lyasa (PAL) gene. *Molecular and General Genetics.* 254:407-416.

- **Parra M., Panda S., Rodríguez N., Torres E. 2011.** Diversity of *Ullucus tuberosus* (Basellaceae) in the Colombian Andes and notes on ulluco domestication based on morphological and molecular data. *Genet Resour Crop Evol* DOI 10.1007/s10722-011-9667-8.
- **Perazzo, G. 2001.** Evaluación de la estabilidad genética de germoplasma de papa (*Solanum* spp) conservados *in vitro* (Tesis Mag. Sc). Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima, Perú.
- **Peredo, EL; Arroyo-García R; Reed, BM; Revilla, MA. 2008.** Genetic and epigenetic stability of cryopreserved and cold-stored hops (*Humulus lupulus* L.). *Cryobiology* 57: 234–241.
- **Peredo EL; Arroyo-García R; Revilla, MA. 2009.** Epigenetic changes detected in micropropagated hop plants. *Journal of Plant Physiology* 166: 1101—1111.
- **Perera, MF; García, MG; Noguera, AS; Sepúlveda, MT; Filippone, MP; Castagnaro, AP. 2010.** Evaluación de la variación somaclonal en vitroplantas de caña de azúcar mediante marcadores moleculares. *Rev. Ind. y Agríc. de Tucumán* Tomo 87 (2): 13-21.
- **Pietilä, L. 1988.** Variabilidad en el germoplasma de ulluco recolectado en Ecuador, Perú, Bolivia y Argentina. En: *Anales del VI Congreso Internacional sobre Cultivos Andinos*, Quito, Ecuador, 30 Mayo-2 Junio, 1988, INIAP. p. 218-222.
- **Pietilä, L; Tapia, M. 1991.** Investigaciones sobre ulluku. Universidad de Turku, Finlandia, 67 p.
- **Piola, F; Rohr, R; Heizmann, P. 1999.** Rapid Detection of genetic variation within and among *in vitro* propagated cedar (*Cedrus libani* Loudon) clones. *Plant Science* 141: (2) 159-163.
- **Polanco, C; Ruiz, ML. 2002.** AFLP analysis of somaclonal variation in *Arabidopsis thaliana* regenerated plants, *Plant Science*, 162, 817.
- **Pontaroli, A; Camadro, E. 2005.** Somaclonal variation in *Asparagus officinalis* plants regenerated by organogenesis from long-term callus cultures. *Genetic Molecular Biology* 28(3): 423-430.
- **Potter, R; Jones, M. 1991.** Molecular analysis of genetic stability. *In vitro* methods for conservation of plant genetic resources. Chapman and Hall. London, UK. 71 – 71.

- **Prado, M; Gonzalez, M; Romo, S; Herrera, M. 2007.** Adventitious plant regeneration on leaf explants from adult male kiwifruit and AFLP analysis of genetic variation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 88: 1–10.
- **Quemeda, H; Toth, E; Lork K. 1987.** Changes in methylation of tissue cultured soybean cell detected by digestion with the restriction enzymes Hpa II and Msp I. *Plant Cell Report* 6: 63 – 66.
- **Rani, V; Raina, S. 2000.** Genetic fidelity of organized meristem derived micropropagated plants: a critical reappraisal. *In Vitro Cellular & Developmental Bio-Plant*. 36: 319-326.
- **Rea, J. 1977.** Cultivo de ulluco - *Ullucus tuberosus* Loz. Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas, Puno, Perú. 10 p.
- **Robles, E. 1981.** Origen y Evaluación de la oca, ulluco y mashua. Centro de Informática para la Investigación Agrícola. Lima, Perú, Universidad Agraria La Molina, p. 17.
- **Roca WM; Mroginski, LA. 1991.** Cultivo de Tejidos en la Agricultura: Fundamentos y Aplicaciones. Cali, Colombia. P. XII, 970.
- **Rosa, J. 1926.** Mutations in the sweet potato. *Journal of heredity*. 17: 167-168.
- **Rousi, A; Jokela, P; Kalliola, R; Pietilä, L; Salo, J; Yli-Rekola, M. (1989).** Morphological variation among clones of ulluco (*Ullucus tuberosus*, Basellaceae) collected in southern Peru. *Economic Bot.* 43 (1): 58-72.
- **Rout, G; Das, P; Goel, S; Raina, S. 1998.** Determination of genetic stability of micropropagated plants of ginger using random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. *Botanical Bulletin of Academia Sinica* 1 (39): 23-27.
- **Sakai, A. 1995.** Cryopreservation of germplasm collection in woody plants. In: Bajaj, Y.P.S. (Ed.), *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, vol. 32, Cryopreservation of Plant Germplasm I, pp.55-69.
- **Sakai, A. 1997.** Potentially valuable cryogenic procedures for cryopreservation of cultured plant meristems. In: Razdan, M.K., Cocking, E.C. (Eds.), *Conservation of Plant Genetic Resources In Vitro*. Science Publishers, New Hampshire, pp. 53-66.
- **Saitou, N; Nei, M. 1987.** "The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees." *Molecular Biology and Evolution*, volume 4, issue 4, pp. 406-425, July 1987.

- **Salís, A. 1986.** Perspectivas y condiciones de promoción de cultivos andinos autóctonos. En: Anales del V Congreso Internacional de Sistemas Agropecuarios Andinos, Puno, 10-14 Marzo, 1986. p. 425-432.
- **Sevilla, R; Holle, M. 2004.** Recursos genéticos vegetales. Edición Luis León Asociados S.R.L. Lima-Perú. 445p.
- **SIEA, 2012.** Boletín del Sistema Integrado de Estadísticas Agrarias (SIEA). Oficina de Estudios Económicos y Estadísticos. Ministerio de Agricultura, Lima, Perú.
- **Singsit, C; Akings, P. 1993.** Genetic variation in monopluids of diploids potatoes and detection of clone-specific random amplified polymorphic DNA markers. *Plant Cell Rep.* 12:144-148.
- **Sneath, P; Sokal, R. 1973.** Numerical Taxonomy. The principles and practice of numerical classification. Freeman and Company. San Francisco. E.U. 358p.
- **Sokal, R; Sneath, P. 1963.** Principles of Numerical Taxonomy. W. H. Freeman and Company. San Francisco – USA. 359p.
- **Sorkheh, K; Shiran, B; Gradziel, TM; Epperson, BK; Martínez-Gómez, P; Asadi, E. 2007.** AFLP as a tool for molecular characterization of almond germplasm: genetic diversity among cultivated genotypes and related wild species of almond, and its relationships with agronomic traits. *Euphytica*, 2007, vol. 156, no. 3, p. 327-344.
- **Sperling, CR. 1987.** Systematic of the Basellacea. Ph.D. Thesis, Harvard University, Cambridge, Massachusetts. 279 p.
- **Talledo, D; Escobar, M. 1996.** Caracterización cariotípica de germoplasma RTA. Laboratorio de Biología Celular y Genética. Memorias. En: **Hermann, M. y Heller, J. 1997.** *Andean Roots and tubers: Ahipa, Arracacha, Maca and Yacon.* Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops. 21. Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, Gatersleben/ International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy.
- **Tapia, ME. 1982.** Agricultura andina, el medio, los cultivos y los sistemas agrícolas de los Andes del Sur del Perú. Proyecto de Investigación de los Sistemas Andinos. Lima, Perú.
- **Tapia, M; Arbizu, C. 1991.** Los sistemas de rotación de los cultivos andinos subexplotados en los Andes del Perú. En: VII Congreso Internacional sobre Cultivos Andinos. Centro Internacional de la papa. Lima, Perú.

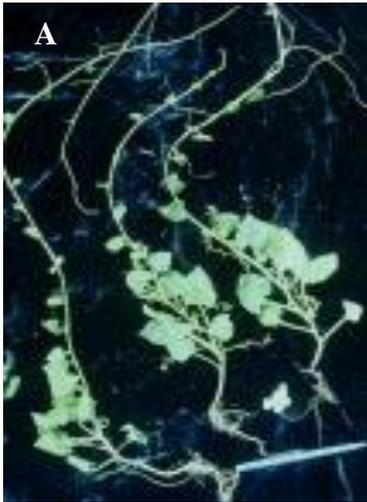
- **Tapia, ME. 1993.** Semillas andinas, el Banco de oro. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONCYTEC). Lima, Perú.
- **Tapia, C; Castillo, R; Mazón, N. 1996.** Catálogo de recursos genéticos de raíces y tubérculos andinos en Ecuador. Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias, Departamento Nacional de Recursos Fitogenéticos y Biotecnología. Quito, Ecuador. P. 180.
- **Tapia, C; Estrella, J; Monteros, A; Valverde, F; Nieto, M; Córdova, J (†). 2004.** Manejo y Conservación de RTAs *in situ* en fincas de agricultores y *ex situ* en el Banco de Germoplasma de INIAP (Capítulo 2). En: V. Barrera; C, tapia y A, Monteros (eds.). Raíces y Tubérculos Andinos: Alternativas para la Conservación y uso sostenible en el Ecuador. Serie: Conservación y uso de la biodiversidad de raíces y tubérculos andinos. Una década de investigación para el desarrollo (1993-2003). N° 4. Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias, Centro Internacional de la Papa, Agencia Suiza para el Desarrollo y la Cooperación. Quito, Ecuador - Lima, Perú. p. 31-74.
- **Templeton-Somers, K; Collins, W. 1986.** Heritability of regeneration in tissue cultures of sweetpotato (*Ipomoea batatas L.*). Theoretical Applied Genetic 71:835-841.
- **Ugarte, ML; Cadima, X. 1996.** Exploración y recolección de oca, papalisa e isaño. En: Informe anual 1995-96 IBTA PROINPA. Cochabamba, Bolivia. Pp. VI 29-VI 36.
- **Ugarte, ML. 1998.** Caracterización bioquímica y molecular (papa) y morfológica (oca, papalisa e isaño). En: Informe anual 1997-98 IBTA PROINPA. Cochabamba, Bolivia. 4p.
- **Ugarte, ML; Villarroel, CL. 1999.** Caracterizaciones complementarias de los Bancos de germoplasma de cultivos andinos: morfológica, bioquímica y citología. En: Informe anual 1998-99. Fundación PROINPA. Cochabamba, Bolivia. 3p.
- **Ugarte, ML; Cadima, X; Lopez, A; Guzman, V. 2001.** Manejo y conservación de las colecciones del Banco de Germoplasma. En: Informe anual 2000-2001. Fundación PROINPA. Cochabamba, Bolivia. 4p.
- **UNCED 1992.** *Convention on Biological Diversity*. United Nations Conference on Environment and Development. Geneva.

- **Valladolid, J; Núñez, E. 1982.** Distribución y arreglos espaciales de los cultivos alto andinos en dos comunidades campesinas. En: Congreso Internacional de Cultivos Andinos, III, La Paz, Bolivia, Feb. 8-12, 1982. p. 413-424.
- **Vargas, D; Castillo, J; Estévez, A; Hernández, M. 2002.** Empleo de la técnica AFLP para la detección de variabilidad en material conservado *in vitro* en el cultivo de la papa (*S. Tuberosum* L.). En: Congreso Científico del INCA (13: 2002, nov 12-15, La Habana) Memorias. CD-ROM. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, 2002. ISBN 959-7023-22-9.
- **Vargas, TE; Xena, N; Vidal, MC; Oropeza, M; de García, E. 2008.** Genetic stability of *solanum tuberosum* l. Cv: Désirée plantlets obtained from embryogenic cell suspension cultures. INCI, Mar 2008, vol.33, no.3, p.213-218. ISSN 0378-1844.
- **Vendrame, WA; Kochert, G; Wetzstein, HY. 1999.** AFLP analysis of variation in pecan somatic embryos, *Plant Cell Reports*, 18, 853.
- **Vieira, R; Nodari, R. 2007.** Genetic diversity of garlic revealed by RAPD markers. *Ciência Rural*, Santa Maria, V.37, N.1, P.51-57. ISSN 0103-8478.
- **Vijay, R; Ajay, P; Raina, S. 1995.** Random amplified polimorphic DNA (RAPD) markers for genetic analysis in micropropagated plants of *Popuus deltoids* Marsh. *Plant Cell Report* 14:459-462.
- **Villalobos, V; Ferreira, P; Mora, A. 1991.** The use of Biotechnology in the conservation of tropical germplasm. *Biotechnology advances*, vol.9, No. 2, pp. 197-215.
- **Vimos, C; Nieto, C; Rivera, M. 1997.** “El melloco: Características, técnicas de cultivo y potencial en Ecuador”. Centro internacional de investigaciones para el desarrollo. CIID. Ecuador.
- **Volk, G; Henk, A; Richards, M. 2004.** Genetic diversity among U.S. garlic clones as detected using AFLP methods. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 129:559-569.
- **Vos, P; Hogers, R; Bleeker, M; Reijans, M; Van de Lee, T; Hornes, M; Frijters, A; Pot, J; Peleman, J; Kuiper, M; Zabeau, M. 1995.** AFLP: A new technique for DNA fingerprinting, *Nucleic Acids Research*, 23, 4407.
- **Withers, L. 1988.** *In vitro* conservation and germplasm utilisation. Brown, A. D. H.; Frankel, O.H.; Marshall, D. R. y Williams, J. T. (eds.). The use of crop genetic resources collection. Cambridge University Press.

- **Xena, N; Vargas, TE; Huérfano, A; de García E. 2000.** Caracterización citogenética del proceso de embriogénesis somática indirecta en medio sólido en *Solanum tuberosum* cv. Désirée. *Acta Botánica Venezuelica*. 23: 97-104.

## VIII. ANEXOS

### ANEXO 1: Plantas de olluco silvestre.



Fuente: Arbizu, 2004. En: López; Hermann. 2004



Fuente: UNSAAC F.C.B. (2008)

**A. En la Comunidad de Sallalli, Ayacucho. (3650 m.; 13° 14' S; 74° 21' O). B. En la Comunidad Campesina de Viacha, Cusco (3400 a 4200 m.; 13° 21' 40" S; 71° 49' 28" O).**

**ANEXO 2: Principales datos pasaporte de las accesiones de ulluco utilizadas en este estudio.**

N°	CIP Number	Nombre de la Accesoión	Fecha de Colección	País	Departamento	Provincia	Distrito	Localidad	Fecha de Introducción	Tiempo de conservación <i>in vitro</i>	Latitud	Longitud
1	201001	Blanco llorón	19910506	PER	Puno	Puno	Puno	Puno	15/02/2009	3 años	15°50'S	70°01' W
2	201002	Paucar oca	19910506	PER	Puno	Puno	Puno	Puno			15°50'S	70°01' W
3	201003	Ccantu de Huancarani	19910506	PER	Puno	Puno	Puno	Puno			15°50'S	70°01' W
4	201004	Zapallu de Huancarani	19910506	PER	Puno	Puno	Puno	Puno			15°50'S	70°01' W
5	201006	Ulluco verde oscuro	19910512	PER	Piura	Piura	Piura	Piura (mercado de)			05°11'S	80°37' W
6	201007	Ulluco verde claro	19910512	PER	Piura	Piura	Piura	Piura (mercado de)	15/02/2009	3 años	05°11'S	80°37' W
7	201008	Ulluco amarillo	19910512	PER	Piura	Piura	Piura	Piura (mercado de)			05°11'S	80°37' W
8	201010	Ulluco blanco	19910603	PER	Cajamarca	Cajamarca	Cajamarca	Chamis			07°09'S	78°30' W
9	201011	Ulluco rosado	19910603	PER	Cajamarca	Cajamarca	Cajamarca	Chamis			07°09'S	78°30' W
10	201012	Ulluco azafrán	19910603	PER	Cajamarca	Cajamarca	Cajamarca	Chamis			07°09'S	78°30' W
11	201013	Ulluco azafrán	19910603	PER	Cajamarca	Cajamarca	Cajamarca	Chamis			07°09'S	78°30' W
12	201015	Ulluco rosado	19910603	PER	Cajamarca	Cajamarca	Cajamarca	Chamis			07°09'S	78°30' W
13	201016	Naranja de Contumazá	19910601	PER	Cajamarca	Cajamarca	Cajamarca	Chamis			07°09'S	78°30' W
14	201017	Ulluco blanco	19910603	PER	Cajamarca	Cajamarca	Cajamarca	Gelicano			07°04'S	78°20' W
15	201018	Rosado pecoso	19910606	PER	Cajamarca	Cajamarca	Cajamarca	Cajamarca			07°09'S	78°30' W
16	201019	Ulluco rosado	19910606	PER	Cajamarca	Cajamarca	Cajamarca	Cajamarca			07°09'S	78°30' W
17	201020	Ulluco rosado	19910606	PER	Cajamarca	Cajamarca	Cajamarca	Cajamarca			07°09'S	78°30' W
18	201021	Ulluco rosado	19910606	PER	Cajamarca	Cajamarca	Cajamarca	Cajamarca			07°09'S	78°30' W
19	201022	Ulluco verde	19910606	PER	Cajamarca	Cajamarca	Cajamarca	Cajamarca			07°09'S	78°30' W
20	201023	Ulluco blanco	19910606	PER	Cajamarca	Cajamarca	Cajamarca	Cajamarca			07°09'S	78°30' W
21	201024	Amarillo ñato	19910606	PER	Cajamarca	Cajamarca	Cajamarca	Cajamarca			07°09'S	78°30' W
22	201025	Olluco rosado	19920822	PER	Cajamarca	Chota	Chota	Rojaspampa - Choctapata	11/02/1993	19 años	06°33'S	78°38' W
23	201026	Olluco percala	19920822	PER	Cajamarca	Chota	Chota	Rojaspampa - Choctapata	11/02/1993	19 años	06°33'S	78°38' W
24	201032	Olluco blogo ahumado	19920822	PER	Cajamarca	Chota	Chota	Rojaspampa	11/02/1993	19 años	06°33'S	78°38' W
25	201034	Ulluco	19921019	PER	Ancash	Yungay	Shupluy	Cochayó	18/05/1993	19 años	09°12'S	77°41' W
26	201035	Ulluco	19921019	PER	Ancash	Yungay	Yungay	Rayán	04/05/1993	19 años	09°08'S	77°44' W
27	201036	Ulluco	19921019	PER	Ancash	Yungay	Yungay	Rayán	04/05/1993	19 años	09°08'S	77°44' W
28	201038	Ulluco	19921019	PER	Ancash	Yungay	Matacoto	Chuchín	18/05/1993	19 años	09°10'S	77°44' W
29	201039	Ulluco	19921020	PER	Ancash	Carhuaz	Carhuac	Huellapu	04/05/1993	19 años	09°15'S	77°41' W
30	201040	Ulluco	19921020	PER	Ancash	Carhuaz	Carhuac	Huellapu	18/05/1993	19 años	09°15'S	77°41' W
31	201049	Chaucha amarilla	19930606	PER	Cajamarca	Cajamarca	Los Baños del Inca	Tartar Chico-Chin Chin	15/02/2009	3 años	07°09'S	78°27' W
32	201050	Blanco percala	19930710	PER	Cajamarca	Chota	Chota	Rambrampata			06°33'S	78°38' W
33	201051	Blanco	19930710	PER	Cajamarca	Chota	Chota	Choctapata	15/02/2009	3 años	06°33'S	78°38' W
34	201052	Rosado	19930710	PER	Cajamarca	Chota	Chota	Rambrampata			06°33'S	78°38' W
35	201053	Pavón	19930710	PER	Cajamarca	Chota	Chota	Lingan Grande			06°33'S	78°38' W
36	201054	Limeño	19930710	PER	Cajamarca	Chota	Chota	Lingan Grande	15/02/2009	3 años	06°33'S	78°38' W
37	201057	Mullo	19930710	PER	Cajamarca	Chota	Chota	Choctapata	15/02/2009	3 años	06°33'S	78°38' W
38	201058	Amarillo	19930710	PER	Cajamarca	Chota	Chota	Choctapata			06°33'S	78°38' W
39	201060	Colorado chico	19930710	PER	Cajamarca	Chota	Chota	Rambrampata			06°33'S	78°38' W
40	201062	Rosado	19930820	PER	Puno	Chucuito	Yunguyo	Apillani			16°14'S	69°05' W
41	201063	Qank'o sak'ampaya	19930820	PER	Puno	Chucuito	Yunguyo	Apillani			16°14'S	69°05' W
42	201065	Rosado cheq'e chequiña	19930820	PER	Puno	Chucuito	Yunguyo	Imicate	11/10/1997	15 años	16°14'S	69°05' W
43	201066	Rojo	19930820	PER	Puno	Chucuito	Yunguyo	Apillani	20/09/1997	15 años	16°14'S	69°05' W
44	201067	K'ello	19930820	PER	Puno	Chucuito	Yunguyo	Imicate	20/09/1997	15 años	16°14'S	69°05' W

N°	CIP Number	Nombre de la Accesión	Fecha de Colección	País	Departamento	Provincia	Distrito	Localidad	Fecha de Introducción	Tiempo de conservación <i>in vitro</i>	Latitud	Longitud
45	201070	K'ello sak'ampaya	19930820	PER	Puno	Chucuito	Yunguyo	Apillani	11/10/1997	15 años	16°14' S	69°05' W
46	201071	Olluco	19920610	PER	Cajamarca	Hualgayoc	Bambamarca	Sumanhuay	11/02/1993	19 años	06°45' S	78°36' W
47	201072	Olluco	19920610	PER	Cajamarca	Hualgayoc	Bambamarca	Sumanhuay	11/02/1993	19 años	06°40' S	78°30' W
48	201073	Olluco	19920610	PER	Cajamarca	Hualgayoc	Bambamarca	Sumanhuay	11/02/1993	19 años	06°40' S	78°30' W
49	201074	Olluco	19920610	PER	Cajamarca	Hualgayoc	Bambamarca	Sumanhuay	11/02/1993	19 años	06°40' S	78°30' W
50	201075	Olluco	19920610	PER	Cajamarca	Hualgayoc	Bambamarca	Chaupilanche	11/02/1993	19 años	06°40' S	78°30' W
51	201111	Kh'aillu lluca		BOL	La Paz	Larecaja		Chojchuni (Sorata)			15°50' S	68°40' W
52	201112	Lloquaila lluma		BOL	La Paz	Larecaja		Chojchuni (Sorata)			15°50' S	68°40' W
53	201115	Cheje ulluma		BOL	La Paz	Larecaja		Quiabaya (Sorata)	29/03/1996	16 años	15°39' S	68°45' W
54	201116	Wila ulluco		BOL	La Paz	Larecaja		Quiabaya (Sorata)			15°39' S	68°45' W
55	201121	Papalisa		BOL	Oruro	Cercado		Oruro	02/02/2000	12 años	17°58' S	67°07' W
56	201122	Papalisa		BOL	Oruro	Cercado		Oruro			17°58' S	67°07' W
57	201123	Papalisa		BOL	Potosí	Tomás Frías		Potosí (Manquiri)			19°36' S	65°40' W
58	201134			PER	Cusco	Calca		Acchahuata (Amparaes)	25/12/1991	21 años		
59	201137			PER					25/12/1991	21 años		
60	201138			PER					25/12/1991	21 años		
61	201139			PER					25/12/1991	21 años		
62	201140			PER					25/12/1991	21 años		
63	201141			PER					25/12/1991	21 años		
64	201142			PER					25/12/1991	21 años		
65	201143			PER					25/12/1991	21 años		
66	201146			PER					25/12/1991	21 años		
67	201147	Grosella oscuro	19931027	PER	Ancash	Pallasca	Conchucos	Toldobamba	15/02/2009	3 años	08°15' S	77°50' W
68	201148	Misha alargado	19931027	PER	Ancash	Pallasca	Conchucos	Toldobamba	20/09/1997	15 años	08°15' S	77°50' W
69	201149	Misha redondo	19931027	PER	Ancash	Pallasca	Conchucos	Cayarenga	20/09/1997	15 años	08°15' S	77°50' W
70	201150	Limon oscuro	19931027	PER	Ancash	Pallasca	Conchucos	Cayarenga	20/09/1997	15 años	08°15' S	77°50' W
71	201153	Amarillo largo	19931027	PER	Ancash	Pallasca	Conchucos	Cayarenga	20/09/1997	15 años	08°15' S	77°50' W
72	201155			PER	Puno	Puno		Puno			15°50' S	70°01' W
73	201159			PER	Puno	Puno		Puno			15°50' S	70°01' W
74	201160			PER	Puno	San Román		Juliaca			15°29' S	70°08' W
75	201163			PER	Cusco	Cusco		Cusco			13°31' S	71°59' W
76	201165			PER	Cusco	Cusco		Cusco			13°31' S	71°59' W
77	201227			PER	Puno	Puno		Puno			15°50' S	70°01' W
78	201228			PER	Puno	San Román	Juliaca	Juliaca (mercado de)			15°29' S	70°08' W
79	201236			PER	Puno	Puno	Paucarcolla	Paucarcolla			15°45' S	70°03' W
80	201238			PER	Puno	Puno	Paucarcolla	Paucarcolla (Cueva de Jimarca)			15°45' S	70°03' W
81	201239			PER	Puno	Puno		Paucarcolla			15°45' S	70°03' W
82	201243			PER	Puno	San Román	Juliaca	Juliaca (mercado de)			15°29' S	70°08' W
83	201245			PER	Cusco	Urubamba	Chincho	Ayllupungu (Chincho)			13°24' S	72°03' W
84	201248			PER	Cusco	Urubamba	Chincho	Ayllupungu (Chincho)			13°24' S	72°03' W
85	201249			PER	Cusco	Urubamba	Chincho	Ayllupungu (Chincho)			13°24' S	72°03' W
86	201254			PER	Cusco	Urubamba	Chincho	Ayllupungu (Chincho)			13°24' S	72°03' W
87	201255			PER	Cusco	Urubamba	Chincho	Mapa (Chincho)			13°25' S	72°03' W
88	201256			PER	Cusco	Urubamba	Chincho	Mapa (Chincho)			13°25' S	72°03' W
89	201258			PER	Cusco	Paucartambo	Paucartambo	Pumapaccha (Paucartambo)			13°30' S	71°30' W
90	201259			PER	Cusco	Paucartambo	Paucartambo	Pacchapata (Paucartambo)			13°30' S	71°30' W
91	201261			PER	Cusco			Biscuchone			13°30' S	71°30' W

N°	CIP Number	Nombre de la Accesoión	Fecha de Colección	País	Departamento	Provincia	Distrito	Localidad	Fecha de Introducción	Tiempo de conservación <i>in vitro</i>	Latitud	Longitud
92	201262			PER	Cusco	Paucartambo	Huancarani	Huancarani			13°30'S	71°39' W
93	201263			PER	Cusco	Calca	Pisac	Pisac (mercado de)			13°25'S	71°51' W
94	201264			PER	Cusco	Calca	Pisac	Pisac (mercado de)			13°25'S	71°51' W
95	201265			PER	Cusco	Calca	Pisac	Saraca (Pisac, mercado de)			13°25'S	71°51' W
96	201267			PER	Cusco	Calca	Pisac	Saraca (Pisac, mercado de)			13°25'S	71°51' W
97	201271			PER	Cusco	Cusco	Cusco	Cusco (mercado de)			13°31'S	71°59' W
98	201272			PER	Cusco	Cusco	Cusco	Cusco (mercado de)			13°31'S	71°59' W
99	201273			PER	Cusco	Cusco	Cusco	Cusco			13°25'S	70°03' W
100	201277			PER	Junín	Tarma	Huaricolca	Huaricolca	24/04/1990	22 años	11°30'S	75°39' W
101	201278			PER	Huánuco	Pachitea	Chaglla	Chaglla	03/04/1990	22 años	09°48'S	75°52' W
102	201279	Moro ulluco		PER	Lima	Cajatambo	Oyón	Ukruschaka			10°40'S	76°46' W
103	201280	Olluco anaranjado		PER	Lima	Cajatambo	Oyón	Ukruschaka			10°40'S	76°46' W
104	201281	Qarwash		PER	Lima	Cajatambo	Oyón	Ukruschaka	06/04/1990	22 años	10°40'S	76°46' W
105	201282			PER	Ancash	Recuay	Catac	Shiki			09°47'S	77°25' W
106	201283	Patito		PER	Ancash	Recuay	Catac	Shiki	24/04/1990	22 años	09°47'S	77°25' W
107	201284			PER	Ayacucho	Lucanas	Chaviña	Chaviña			14°58'S	73°50' W
108	201285	Papa lisa		PER	Puno	San Román	Cabanillas	Cupe	04/04/1990	22 años	15°38'S	70°20' W
109	201288	Yuraq ulluco		PER	Apurímac	Chincheros	Uripa	Totorabamba	24/04/1990	22 años	13°31'S	73°40' W
110	201289	Rosado lisas		PER	Apurímac	Graú	Chuquibambilla	Chuquibambilla	06/04/1990	22 años	14°06'S	72°42' W
111	201292	Papa lisas		PER	Cusco	Canchis	Tinta	Sullaya			14°08'S	71°24' W
112	201293			PER	Ayacucho	Huamanga	Ayacucho	Ayacucho	03/05/1990	22 años	13°09'S	74°13' W
113	201294			PER	Puno	Chucuito	Desaguadero	Desaguadero	11/10/1997	15 años	16°33'S	69°02' W
114	201307			BOL	La Paz	Lerecaja	Sorota	Sorota	02/02/1998	14 años	15°45'S	68°35' W
115	201310			PER	Cusco	Paucartambo		Pampacocha (Paucartambo)	25/12/1991	21 años		
116	201311			PER	Cusco	Calca		Cuyo Gra (Pisac)	25/12/1991	21 años		
117	201312			PER	Cusco	Calca		Ampay (Pisac)	25/12/1991	21 años		
118	201313			PER	Cusco	Urubamba		Ayllupunco (Chincho)	25/12/1991	21 años		
119	201314			PER	Cusco	Paucartambo		Biscochoni	25/12/1991	21 años		
120	201315	Huahuaquepe		PER	Cusco	Paucartambo		Cesacpata (Paucartambo)	25/12/1991	21 años		
121	201316			PER	Cusco	Calca		Cuyo Gra (Pisac)	25/12/1991	21 años		
122	201317	Huahuaquepe		PER	Cusco	Urubamba		Ayllupunco (Chincho)	25/12/1991	21 años		
123	201318			PER	Cusco	Paucartambo		Huaynapata (Paucartambo)	25/12/1991	21 años		
124	201319			PER	Cusco	Urubamba		Marao (Chincho)	25/12/1991	21 años		
125	201320	Papa lisas		PER	Cusco	Urubamba		Ayllupunco (Chincho)				
126	201321	Huahuaquepe		PER	Cusco	Paucartambo		Cesacpata (Paucartambo)	25/12/1991	21 años		
127	201322	Huahuaquepe		PER	Cusco	Urubamba		Ayllupunco (Chincho)	25/12/1991	21 años		
128	201323			PER	Cusco	Calca		Sacaca (Pisac)	25/12/1991	21 años		
129	201324			PER	Cusco	Calca		Cuyo Grande (Pisac)	25/12/1991	21 años		
130	201325			PER	Cusco	Paucartambo		Pumapacchi (Paucartambo)	25/12/1991	21 años		
131	201327			PER	Cusco	Paucartambo		Biscochoni (Paucartambo)	25/12/1991	21 años		
132	201328			PER	Cusco	Urubamba		Palccaraqui (Chincho)	25/12/1991	21 años		
133	201329			PER	Cusco	Paucartambo		Sarcco (Paucartambo)	25/12/1991	21 años		
134	201330			PER	Cusco	Paucartambo		Huancarani (Paucartambo)	25/12/1991	21 años	13°39'S	71°39' W
135	201331			PER	Cusco	Paucartambo		Pumapacchi (Paucartambo)	25/12/1991	21 años		
136	201332			PER	Cusco	Paucartambo		Pacpapata (Paucartambo)	25/12/1991	21 años		
137	201333			PER	Cusco?				25/12/1991	21 años		
138	201334			PER	Cusco	Calca		Ampay (Pisac)	25/12/1991	21 años		

N°	CIP Number	Nombre de la Accesoión	Fecha de Colección	País	Departamento	Provincia	Distrito	Localidad	Fecha de Introducción	Tiempo de conservación <i>in vitro</i>	Latitud	Longitud
139	201335			PER	Cusco?				25/12/1991	21 años		
140	201337			PER	Cusco?				25/12/1991	21 años		
141	201338			PER	Cusco?				25/12/1991	21 años		
142	201339			PER	Cusco?				25/12/1991	21 años		
143	201341			PER	Cusco?				25/12/1991	21 años		
144	201342			PER	Cusco	Cispicanchi		Ccutupucyo (Ccutupucyo)	25/12/1991	21 años		
145	201343			PER	Cusco?				25/12/1991	21 años		
146	201345			PER	Cusco?				25/12/1991	21 años		
147	201346		19870000	PER	Cusco?				25/12/1991	21 años		
148	201349		19870000	PER	Cusco	Paucartambo		Huancaniyoc	25/12/1991	21 años		
149	201351			PER	Cusco	Paucartambo		Huancaniyoc (Huasaq)	25/12/1991	21 años		
150	201352			PER	Cusco	Paucartambo		Kata Cancha (Huancarani-Quifer)	25/12/1991	21 años	13°39'S	71°39' W
151	201353			PER	Cusco	Paucartambo		Chusocani (Huancarani-Pitucancho)	25/12/1991	21 años	13°39'S	71°39' W
152	201354			PER	Cusco	Paucartambo		Chusocani (Huancarani-Pitucancho)	25/12/1991	21 años	13°39'S	71°39' W
153	201355			PER	Cusco	Paucartambo		Quiñer (Huancarani-Quifer)	25/12/1991	21 años	13°39'S	71°39' W
154	201356			PER	Cusco	Quispicanchi		Ccasapata (Quispicanchi-Cuyuni)	25/12/1991	21 años		
155	201357			PER	Cusco	Quispicanchi		Quespeccasa (Quispicanchi-Ccopi)	25/12/1991	21 años		
156	201358			PER	Cusco	Quispicanchi		Ccoyapampa (Quispicanchi)	25/12/1991	21 años		
157	201359			PER	Cusco	Quispicanchi		Hatun Rumi (Ocongate)	25/12/1991	21 años		
158	201360			PER	Cusco	Paucartambo		Añubamba (Paucartambo)	25/12/1991	21 años		
159	201361			PER	Cusco	Paucartambo		Moccapata (Huancarani-Chusa)	25/12/1991	21 años		
160	201362			PER	Cusco	Paucartambo		Llailipampa (Huancarani)	25/12/1991	21 años		
161	201364			PER	Cusco	Paucartambo		Pitucancho (Huancarani)	25/12/1991	21 años		
162	201365			PER	Cusco	Paucartambo		Pitucancho (Huancarani)	25/12/1991	21 años		
163	201367			PER	Cusco	Paucartambo		Jayahuana (Challabamba)	25/12/1991	21 años		
164	201368			PER	Cusco	Quispicanchi		Chuchapaya (Ccatoca)	25/12/1991	21 años		
165	201369			PER	Cusco	Paucartambo		Pitucancho (Huancarani)	25/12/1991	21 años		
166	201370			PER					25/12/1991	21 años		
167	201371			PER	Huancavelica	Tayacaja	Coris	Coris			12°34'S	
168	201373	Huariaca		PER	Junín	Tarma	Huaricolca	Huaricolca			11°30'S	75°39' W
169	201374			PER	Junín	Tarma	Huaricolca	Huaricolca			11°30'S	75°39' W
170	201375	Ulluco		PER	Pasco	Pasco	Paucartambo	La Victoria			10°46'S	75°48' W
171	201377			PER	Pasco	Pasco	Paucartambo	La Victoria	20/09/1997	15 años	10°46'S	75°48' W
172	201378			PER	Pasco	Pasco	Yanacancha	San Miguel	20/09/1997	15 años	10°29'S	76°30' W
173	201379			PER	Cajamarca	San Ignacio	San Ignacio	San Ignacio			05°07'S	78°59' W
174	201380			PER	Amazonas	Chachapoyas	Granada	Granada	15/02/2009	3 años	06°03'S	77°36' W
175	201381			PER	Amazonas	Chachapoyas	Granada	Granada			06°03'S	77°36' W
176	201382			PER	Amazonas	Chachapoyas	Leimebamba	Quinramachay			06°33'S	77°48' W
177	201383			PER	Amazonas	Chachapoyas	Leimebamba	Quinramachay			06°33'S	77°48' W
178	201384			PER	Cajamarca	Cajamarca	Encañada	La Encañada	20/09/1997	15 años	07°04'S	78°20' W
179	201385			PER	Cajamarca	Cajamarca	Cajamarca	Pariamarca			07°09'S	78°30' W
180	201387			PER	Cajamarca	Chota	Chota	Cumalca	20/09/1997	15 años	06°33'S	78°38' W
181	201388			PER	Cajamarca	Cutervo	Cutervo	Angurra			06°22'S	78°48' W
182	201389	Olluco		PER	Cajamarca	Santa Cruz	Santa Cruz	San Juan de Dios			06°37'S	78°56' W
183	201390			PER	Lima	Huaral	Atavillos Altos	Pasac	20/09/1997	15 años	11°13'S	76°39' W
184	201391			PER	Lima	Cajatambo	Oyón	Ukuschaka			10°40'S	76°46' W
185	201394			PER	Ancash	Recuay	Pampas	Tunkumachay			10°06'S	77°23' W

N°	CIP Number	Nombre de la Accesoión	Fecha de Colección	País	Departamento	Provincia	Distrito	Localidad	Fecha de Introducción	Tiempo de conservación <i>in vitro</i>	Latitud	Longitud
186	201396			PER	Ancash	Bolognesi	Cajacay	Sequespampa	15/02/2009	3 años	10°09'S	77°26' W
187	201397			PER	Ancash	Bolognesi	Cajacay	Sequespampa	20/09/1997	15 años	10°09'S	77°26' W
188	201398			PER	Ancash	Bolognesi	Chiquián	Chiquián	15/02/2009	3 años	10°08'S	77°09' W
189	201399			PER	Ancash	Recuay	Catac	Shiki	20/09/1997	15 años	09°47'S	77°25' W
190	201400			PER	Ancash	Recuay	Catac	Shiki			09°47'S	77°25' W
191	201401			PER	Ancash	Recuay	Catac	Shiki	20/09/1997	15 años	09°47'S	77°25' W
192	201402			PER	Ancash	Huaraz	Huaraz	Huaraz			09°31'S	77°31' W
193	201403			PER	Ancash	Sihuas	Sihuas	Palo Seco			08°33'S	77°37' W
194	201404			PER	Ancash	Sihuas	Sicsibamba	Tashta			08°37'S	77°31' W
195	201406			PER	Ancash	Sihuas	Sicsibamba	Tashta	11/10/1997	15 años	08°37'S	77°31' W
196	201407			PER	Ancash	Sihuas	Cashapampa	Pasacancha			08°33'S	77°39' W
197	201408			PER	Ancash	Sihuas	Cashapampa	Pasacancha			08°33'S	77°39' W
198	201409			PER	Ancash	Sihuas	Cashapampa	Pasacancha			08°33'S	77°39' W
199	201410			PER	Ancash	Sihuas	Cashapampa	Pasacancha			08°33'S	77°39' W
200	201411			PER	La Libertad	Otuzco	Otuzco	Otuzco	20/09/1997	15 años	07°53'S	78°33' W
201	201412			PER	La Libertad	Otuzco	Otuzco	Otuzco	14/05/1997	15 años	07°53'S	78°33' W
202	201413			PER	La Libertad	Otuzco	Otuzco	Otuzco	20/09/1997	15 años	07°53'S	78°33' W
203	201414			PER	La Libertad	Otuzco	Otuzco	Otuzco	20/09/1997	15 años	07°53'S	78°33' W
204	201415			PER	La Libertad	Otuzco	Agallpampa	Mótil	20/09/1997	15 años	07°58'S	78°32' W
205	201416			PER	La Libertad	Otuzco	Agallpampa	Mótil	20/09/1997	15 años	07°58'S	78°32' W
206	201417			PER	La Libertad	Sánchez Carrión	Huamachuco	La Ramada			07°48'S	78°02' W
207	201418			PER	La Libertad	Sánchez Carrión	Huamachuco	Yamobamba			07°48'S	78°02' W
208	201419	Olloco rojo		PER	La Libertad	Sánchez Carrión	Huamachuco	Yamobamba			07°48'S	78°02' W
209	201420			PER	La Libertad	Sánchez Carrión	Huamachuco	Yamobamba			07°48'S	78°02' W
210	201421	Olloco rojo		PER	La Libertad	Sánchez Carrión	Huamachuco	Yamobamba			07°48'S	78°02' W
211	201422	Olloco verde claro		PER	La Libertad	Sánchez Carrión	Huamachuco	Yamobamba			07°48'S	78°02' W
212	201424	Papa lisa larga		PER	Puno	Puno	Puno	Puno			15°50'S	70°01' W
213	201425			PER	Junín?	Huancayo?			20/09/1997	15 años		
214	201426			PER	Junín?	Huancayo?			20/09/1997	15 años		
215	201427			PER	Junín	Concepción	Santa Rosa de Ocopa	Huánchar	15/02/2009	3 años	11°52'S	75°17' W
216	201428			PER	Junín	Concepción	Santa Rosa de Ocopa	Huánchar	15/02/2009	3 años	11°52'S	75°17' W
217	201429			PER	Junín	Concepción	Santa Rosa de Ocopa	Huánchar	15/02/2009	3 años	11°52'S	75°17' W
218	201430			PER	Junín	Concepción	Santa Rosa de Ocopa	Huánchar	15/02/2009	3 años	11°52'S	75°17' W
219	201431			PER	Junín	Concepción	Santa Rosa de Ocopa	Huánchar	15/02/2009	3 años	11°52'S	75°17' W
220	201432			PER	Junín	Concepción	Santa Rosa de Ocopa	Huánchar	15/02/2009	3 años	11°52'S	75°17' W
221	201433			PER	Junín	Concepción	Santa Rosa de Ocopa	Huánchar	15/02/2009	3 años	11°52'S	75°17' W
222	201434			PER	Junín	Concepción	Santa Rosa de Ocopa	Huánchar	15/02/2009	3 años	11°52'S	75°17' W
223	201435			PER	Junín	Concepción	Santa Rosa de Ocopa	Huánchar	15/02/2009	3 años	11°52'S	75°17' W
224	201436	Rosado	19930606	PER	Cajamarca	Cajamarca	Los Baños del Inca	Chaquil-El Capuli	15/02/2009	3 años	07°09'S	78°27' W
225	201437			PER	Piura	Huancabamba	Huancabamba	Toclapite	15/02/2009	3 años	05°14'S	79°26' W
226	201438			PER	Piura	Huancabamba	Huancabamba	Toclapite	15/02/2009	3 años	05°14'S	79°26' W
227	201439			PER	Piura	Huancabamba	Huancabamba	Toclapite	15/02/2009	3 años	05°14'S	79°26' W
228	201440			PER	Piura	Huancabamba	Huancabamba	Toclapite	15/02/2009	3 años	05°14'S	79°26' W
229	201442			PER	Piura	Huancabamba	Huancabamba	Toclapite	15/02/2009	3 años	05°14'S	79°26' W
230	201443			PER	Piura	Huancabamba	Huancabamba	Cerro Burro, Cacerío La Lima	20/09/1997	15 años	05°14'S	79°26' W
231	201444			PER	Piura	Huancabamba	Huancabamba	Cerro Burro, Cacerío La Lima	20/09/1997	15 años	05°14'S	79°26' W
232	201445			PER	Piura	Huancabamba	Huancabamba	Cerro Burro, Cacerío La Lima	15/02/2009	3 años	05°14'S	79°26' W

N°	CIP Number	Nombre de la Adquisición	Fecha de Colección	País	Departamento	Provincia	Distrito	Localidad	Fecha de Introducción	Tiempo de conservación <i>in vitro</i>	Latitud	Longitud
233	201446			PER	Piura	Huancabamba	Huancabamba	Cerro Burro, Cacerío La Lima	15/02/2009	3 años	05°14'S	79°26' W
234	201447			PER	Piura	Huancabamba	Huancabamba	Parcelación Chivato- Juzagara	15/02/2009	3 años	05°14'S	79°26' W
235	201448			PER	Piura	Huancabamba	Huancabamba	Parcelación Chivato- Juzagara	15/02/2009	3 años	05°14'S	79°26' W
236	201449			PER	Piura	Huancabamba	Huancabamba	Parcelación Nueva Esperanza	15/02/2009	3 años	05°14'S	79°26' W
237	201450			PER	Pasco	Pasco	Huachón	Quiparacra			10°38'S	75°56' W
238	201451			PER	Pasco	Pasco	Huachón	Quiparacra	20/09/1997	15 años	10°38'S	75°56' W
239	201452			PER	Pasco	Pasco	Huachón	Huachón	20/09/1997	15 años	10°38'S	75°56' W
240	201453			PER	Pasco	Pasco	Huachón	Huachón	15/02/2009	3 años	10°38'S	75°56' W
241	201454			PER	Pasco	Pasco	Huachón	Huachón	20/09/1997	15 años	10°38'S	75°56' W
242	201455			PER	Pasco	Pasco	Huachón	Huachón	15/02/2009	3 años	10°38'S	75°56' W
243	201457			PER	Pasco	Pasco	Ninacaca	Chipa	20/09/1997	15 años	10°51'S	76°06' W
244	201458			PER	Pasco	Pasco	Ninacaca	Chipa	20/09/1997	15 años	10°51'S	76°06' W
245	201459			PER	Pasco	Pasco	Ninacaca	Chipa	20/09/1997	15 años	10°51'S	76°06' W
246	201460			PER	Pasco	Pasco	Ninacaca	Chipa	14/05/1997	15 años	10°51'S	76°06' W
247	201461			PER	Pasco	Pasco	Ninacaca	Chipa	20/09/1997	15 años	10°51'S	76°06' W
248	201462			PER	Pasco	Pasco	Ninacaca	Chipa	20/09/1997	15 años	10°51'S	76°06' W
249	201463			PER	Pasco	Pasco	Ninacaca	Chipa	14/05/1997	15 años	10°51'S	76°06' W
250	201464			PER	Pasco	Pasco	Ninacaca	Chipa	20/09/1997	15 años	10°51'S	76°06' W
251	201465			PER	Pasco	Pasco	Ninacaca	Chipa	20/09/1997	15 años	10°51'S	76°06' W
252	201466			PER	Pasco	Pasco	Ninacaca	Chipa			10°51'S	76°06' W
253	201467			PER	Pasco	Pasco	Ninacaca	Chipa	20/09/1997	15 años	10°51'S	76°06' W
254	201468			PER	Pasco	Pasco	Ninacaca	Carhuac	20/09/1997	15 años	10°51'S	76°06' W
255	201469			PER	Pasco	Pasco	Ninacaca	Socorro	20/09/1997	15 años	10°51'S	76°06' W
256	201470			PER	Pasco	Pasco	Ninacaca	Socorro	20/09/1997	15 años	10°51'S	76°06' W
257	201471			PER	Pasco	Pasco	Ninacaca	Socorro	16/04/1997	15 años	10°51'S	76°06' W
258	201473			PER	Pasco	Pasco	Ninacaca	Socorro	16/04/1997	15 años	10°51'S	76°06' W
259	201474			PER	Pasco	Pasco	Ninacaca	Socorro	14/05/1997	15 años	10°51'S	76°06' W
260	201475			PER	Pasco	Pasco	Ninacaca	Socorro	20/09/1997	15 años	10°51'S	76°06' W
261	201476			PER	Pasco	Pasco	Ninacaca	Socorro	16/04/1997	15 años	10°51'S	76°06' W
262	201479			PER	Pasco?	Pasco?			16/04/1997	15 años		
263	201480			PER	Pasco?	Pasco?			16/04/1997	15 años		
264	201481			PER	Pasco?	Pasco?			16/04/1997	15 años		
265	201483			PER	Junín	Tarma	Tapo		12/02/1996	16 años	11°23'S	75°33' W
266	201489			PER					20/09/1997	15 años		
267	201490			PER					20/09/1997	15 años		
268	201492			PER	Cajamarca				15/02/2009	3 años		
269	201494			PER	Cajamarca				15/02/2009	3 años		
270	201495			PER	Cajamarca				15/02/2009	3 años		
271	201496			PER	Cajamarca				15/02/2009	3 años		
272	201497			PER	Junín?				15/02/2009	3 años		
273	201499			PER	Junín?				15/02/2009	3 años		
274	201501			PER	Junín?				15/02/2009	3 años		
275	201502			PER	Junín?				15/02/2009	3 años		
276	201503			PER	Junín?				15/02/2009	3 años		
277	201504			PER	Junín?				15/02/2009	3 años		
278	201505			PER	Junín?				15/02/2009	3 años		
279	201506			PER	Junín?				15/02/2009	3 años		

N°	CIP Number	Nombre de la Adcesión	Fecha de Colección	País	Departamento	Provincia	Distrito	Localidad	Fecha de Introducción	Tiempo de conservación <i>in vitro</i>	Latitud	Longitud
280	201507			PER	Junín?				17/12/2009	3 años		
281	201508			PER	Junín?				15/02/2009	3 años		
282	201510			PER	Junín?				15/02/2009	3 años		
283	201511			PER	Junín?				15/02/2009	3 años		
284	201513			PER	Junín?				15/02/2009	3 años		
285	201514			PER	Junín?				15/02/2009	3 años		
286	201517		19920000	PER	Puno?				29/04/2010	3 años		
287	201519		19920000	PER	Puno?				15/02/2009	3 años		
288	201522	Olluco		PER	Cajamarca	Santa Cruz	Santa Cruz	San Juan de Dios	29/04/2010	3 años	06°37'S	78°56' W
Los subcultivos del material conservado se realizan una vez por año.												

**ANEXO 3:** Lista y detalles de los protocolos de AFLP. El protocolo está basado en Vos *et al.* (1995) y optimizado para usar todos los reactivos en el CIP.

<b>A. Digestión</b>	
Reactivo	1 Rx (µL)
Tampón de restricción 5X	8
Cloruro de sodio (0.5 M)	4
Suero de albúmina bovina (10 mg/mL)	0.4
<i>Mse I</i> NEB (10 U/L)	0.5
<i>Eco RI</i> NEB (20 U/L)	0.25
ADN	500ng
Agua libre de nucleasas	Up to 40 µL

Incubar por 3 h a 37 °C. No inactivar la enzima de restricción

<b>C. Amplificación Preselectiva</b>	
Reactivo	1 Rx (µL)
Tampón de PCR 10X	2.5
Desoxiribonucleotidos (5 mM)	1.25
Iniciador E-00 (50 ng/µL)	1
Iniciador M-00 (50 ng/µL)	1
Taq Polimerasa N (1:2)	0.1
Producto de digestión-ligación diluido (1:4)	5
Agua libre de nucleasas	Up to 25 µL

Usar tampón T10E0.1 para las diluciones. Los rangos de dilución pueden ser modificados de acuerdo a la intensidad de las bandas.

<b>B. Ligación</b>	
Reactivo	1 Rx (µL)
T4 Tampón de ligación NEB (10X)	2
Cloruro de sodio (0.5 M)	1
ATP (10 mM)	1
Suero de albúmina bovina (10 mg/mL)	0.1
Adaptador <i>Mse</i> (50 µM)	1
Adaptador <i>Eco</i> (50 µM)	1
T4 ADN ligasa NEB (2000 U/µL)	0.035
Agua libre de nucleasas	Up to 10 µL

Incubar toda la noche (16 h) a temperatura ambiente (20 - 25 °C)

<b>D. Amplificación selectiva</b>	
Reactivo	1 Rx (µL)
Tampón de PCR 10X	1.1
Desoxiribonucleotidos (5 mM)	0.6
Iniciador E+3 (50 ng/µL)	0.5
Iniciador M+3 (50 ng/µL)	0.2
Taq Polimerasa P (1:4)	0.12
Producto de preamplificación diluido (1:10)	5
Agua libre de nucleasas	Up to 10 µL

## PCR- Reacción en Cadena de la Polimerasa

Las condiciones PCR para los marcadores AFLP tienen dos diferentes programas llamados Pre-amplificación y Amplificación Selectiva:

### Pre-amplificación:

1° paso	1 ciclo de	94°C por 4 minutos
2° paso	20 ciclo de	94°C por 30 segundos 56°C por 30 segundos 72°C por 60 segundos
3° paso	1 ciclo de	72°C por 4 minutos

### Amplificación Selectiva:

1° paso 1	ciclo de	94°C por 4 minutos
2° paso 11	ciclo de	94°C por 20 segundos 66°C por 30 segundos (-1°C por ciclo) 72°C por 2 minutos
3° paso	20 ciclo de	94°C por 20 segundos 56°C por 30 segundos 72°C por 2 minutos
4° paso	1 ciclo de	72°C por 4 minutos

**ANEXO 4:** Lista de descriptores de olluco (IPGRI/CIP, 2003).

## **DESCRIPTORES DE LA PLANTA**

### **I Datos vegetativos**

#### **1. Porte de la planta**

- 1 Erecta
- 2 Rastrera

#### **2. Elongación de tallos**

- 0 Ausencia de tallos elongados
- 1 Tallos elongados erectos
- 2 Tallos elongados decumbentes
- 3 Tallos elongados rastreros

#### **3. Color de los tallos**

- 1 Verde amarillento claro (145 A-D)
- 2 Verde amarillento claro predominante (145 A-D) con rojo claro (rosado) (51C, D) irregularmente distribuido a lo largo del tallo
- 3 Rojo grisáceo predominante (178B) con verde amarillento (146C, D) irregularmente distribuido a lo largo del tallo
- 4 Rojo grisáceo (178A,B; 182A,B)

#### **4. Pigmentación de aristas/ángulos en los tallos**

- 0 Ausente
- 1 Presente

#### **5. Forma de la lámina**

- 1 Ovada
- 2 Cordada
- 3 Deltoide
- 4 Semi-reniforme

**6. Color de follaje**

- 1 Verde amarillento claro (145A, 146D)
- 2 Verde amarillento (146A)
- 3 Verde amarillento oscuro (147A)

**7. Color del envés**

- 1 Verde amarillento claro (146B-D)
- 2 Verde amarillento claro (146B-D) con púrpura rojizo (59A-D)
- 3 Púrpura rojizo\* (59A-D)

**8. Color del pecíolo**

- 1 Verde amarillento claro (144A-D)
- 2 Verde amarillento (144 A,B; 146A-C) con arista/ ángulo pigmentado
- 3 Rojo grisáceo predominante (178A-D) con verde amarillento (146B)
- 4 Púrpura grisáceo predominante (183D) con verde amarillento (146B)

**9. Hábito de floración**

- 0 Ausente
- 3 Escasa
- 5 Moderada
- 7 Abundante

**10. Forma del eje de la inflorescencia (raquis)**

- 1 Predominantemente recto
- 2 Predominantemente en zigzag

**11. Color del eje de la inflorescencia (raquis)**

- 1 Verde amarillento claro (144 A-D)
- 2 Verde amarillento (144A,B; 146B-D) con púrpura rojizo (58A,B) irregularmente distribuido
- 3 Púrpura rojizo predominante (58A; 59A,B) con verde

**12. Color de los sépalos**

- 1 Verde amarillento (150D; 154C,D)

2 Púrpura rojizo claro (58C,D)

3 Púrpura rojizo (58A; 59A,B)

**13. Color de los pétalos**

1 Verde amarillento (151C,D)

2 Verde amarillento (151C,D) con ápice púrpura rojizo (59B-D)

3 Verde amarillento (151C,D) con ápice y bordes púrpura rojizo (59A-C)

4 Púrpura rojizo (59A,B) con fondo amarillo naranja (14C; 15C,D)

**14. Tendencia a formar flores con más de cinco pétalos**

0 Ausente

1 Presente

**II Datos del tubérculo**

**15. Color predominante de la superficie de los tubérculos**

1 Verde amarillento (145B-D,147D, 148D)

2 Blanco amarillento (8D)

3 Amarillo (10A)

4 Amarillo oscuro (13B)

5 Amarillo grisáceo (162C)

6 Amarillo naranja (19A)

7 Naranja pálido (22A; 24B)

8 Naranja (26A,B)

9 Naranja rojizo (33A)

10 Rojo claro (rosado) (51C,D)

11 Rojo (46D)

12 Púrpura rojizo (61A)

**16. Color secundario de la superficie de los tubérculos**

0 Ausente

1 Blanco amarillento (4D)

2 Rojo palido (rosado) (54C)

3 Purpura rojizo (61A)

**17. Distribución del color secundario de la superficie de los tubérculos**

- 0 Ausente
- 1 Ojos
- 2 Irregularmente distribuido
- 3 Ojos e irregularmente distribuidos

**18. Tendencia a la producción de quimeras**

- 0 Ausente
- 1 Presente

**19. Forma general del tubérculo**

- 1 Redondo
- 2 Cilíndrico
- 3 Semifalcado
- 4 Retorcido

**20. Color de la zona cortical**

- 1 Verde amarillento (145B,C)
- 2 Blanco amarillento (4D)
- 3 Amarillo (12C; 13A)
- 4 Naranja (26A)
- 5 Naranja rojizo (33A-D)
- 6 Rojo claro (rosado) (50C; 51C,D)
- 7 Rojo (46D, 53B)
- 8 Púrpura rojizo (61A)

**21. Color del cilindro central**

- 1 Verde amarillento (145B,C)
- 2 Blanco (155A-D)
- 3 Blanco amarillento (4D)
- 4 Amarillo (12C; 13A)
- 5 Naranja amarillento (20B)

**ANEXO 5: Composición de sales de Murashigue y Skoog (1962) para medios de cultivo de olluco.**

<b>Componentes</b>	<b>mg/l</b>
<b>Macronutrientes</b>	
KNO <sub>3</sub>	1900
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	440
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	370
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170
<b>Micronutrientes</b>	
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	27.8
Na <sub>2</sub> EDTA	37.3
MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	22.3
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	8.6
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.3
KL	0.83
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0.25
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0.025
CoCl <sub>2</sub> .H <sub>2</sub> O	0.025
Murashigue y Skoog, 1962.	

**ANEXO 6: Composición de los medios de cultivo utilizado para micropropagación y conservación *in vitro* de olluco en el CIP.**

<b>Solución madre</b>	
Agua destilada c.s.p	250 mL
Glicina HCL	0.500 g
Acido Nicotínico	0.125 g
Piridoxina HCL	0.125 g
Tiamina HCL	0.025 g
Myo- Inositol	25 g
Dispensar en viales de 2ml (Usar 1 ml /L)	
<b>Medio de propagación</b>	
Agua destilada c.s.p	1000 ml
MS	1 Litro
Solución Madre	1 ml
Sucrosa	20 g
Pantotenato de Calcio (1000 ppm)	2 ml
Agar/ Phytigel	7 g / 3 g
pH = 5.6	
<b>Medio de conservación</b>	
Agua destilada c.s.p	1000 ml
MS	1 Litro
Solución Madre	1 ml
Sucrosa	20 g
Pantotenato de Calcio (1000 ppm)	2 ml
Sorbitol (Mannitol)	40 g/ 30 g /20g
Agar	7 gr.
18 -22 °C, 3000 Lux y 16 h luz	pH = 5.6
<b>Medio para meristemas</b>	
Agua destilada c.s.p	1000 ml
MS	1 Litro
Solución Madre	1 ml
Sucrosa	30 g
Pantotenato de Calcio (1000 ppm)	2 ml.
Ac. Giberélico (1000ppm)	0.5 ml
Agar/Phytigel	7 gr/ 3g
pH = 5.6	