

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL
DE HUAMANGA**

FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

ESCUELA PROFESIONAL DE AGRONOMÍA



**Estandarización de PCR “gen *Sen2*” de resistencia a
Synchytrium endobioticum y componentes de rendimiento en
papas nativas, Pampa del Arco, Ayacucho 2756 m.s.n.m.**

Tesis para optar el título profesional de:

Ingeniero Agrónomo

Presentado por:

Bach. Luis Enrique Vargas Cordova

Asesor:

Ph.D. Germán Fernando De La Cruz Lapa

Ayacucho - Perú

2024

A mis queridos padres Ricardo y Tarsis por su apoyo incondicional en esta etapa de desarrollo profesional.

A mis hermanos Diego, Marco, Celia, Erika y Raquel, por compartir momentos únicos e inolvidables.

A mis maestros, por haberme compartido sus conocimientos y sabiduría en mi etapa profesional.

A mis amigos y compañeros de la universidad con quienes compartí momentos inolvidables de felicidad

A ti Cristina que llegaste a formar parte importante en mi vida.

Luis E.

AGRADECIMIENTO

A la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga (UNSCH), alma mater y mi segundo hogar, por acogerme en sus puertas y brindarme el apoyo necesario para mi formación profesional.

Al Ph.D. German Fernando De La Cruz Lapa, asesor de la presente investigación quien me dio la confianza y oportunidad de ser parte del grupo de investigación que lidera.

Al Circulo de Estudios e Investigación de Genética, Genómica y Biotecnología (CEIGB), por haberme acogido a sus filas de investigación.

Al Laboratorio de Genética y Biotecnología Vegetal (LGBV) de la Escuela Profesional de Agronomía.

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
Dedicatoria.....	ii
Agradecimiento.....	iii
Índice general.....	iv
Índice de tablas	vii
Índice de figuras.....	ix
Índice de anexos.....	xi
Resumen.....	xii
Introducción	1
CAPÍTULO I	4
MARCO TEÓRICO	4
1.1. Generalidades de la papa	4
1.2. Papas nativas	4
1.3. Ploidia.....	5
1.4. Acido desoxirribonucleico, ADN.....	5
1.4.1. Gen	6
1.5. <i>Synchytrium endobioticum</i>	7
1.5.1. Taxonomía <i>Synchytrium endobioticum</i>	9
1.5.2. Epidemiologia.....	9
1.6. Reacción en cadena de la polimerasa, PCR punto final	10
1.6.1. Electroforesis	10
1.7. PCR tiempo real (qPCR)	10
1.8. Componentes de rendimiento	11
1.9. Medioambiente (A).	11
1.10. Fenotipo (F).....	12
1.11. Antecedentes relacionados al análisis molecular para el gen <i>Sen2</i>	12
1.11.1 Extracción de ADN de papa	13
1.11.2. Marcadores moleculares para el gen <i>Sen2</i>	13
1.11.3. Los cebadores (primer)	14
1.11.4. Reacción en cadena de polimerasa (PCR) para el gen <i>Sen2</i>	14
1.11.5. Electroforesis para el gen <i>Sen2</i>	14
1.12. Antecedentes de Componentes de rendimiento de papas.....	14
CAPÍTULO II.....	16

METODOLOGÍA	16
2.1. Lugar del experimento.....	16
2.1.1. Ubicación política.....	16
2.1.2. Ubicación geográfica.....	16
2.2. Antecedentes del terreno	17
2.3. Condiciones climáticas.....	18
2.4. Análisis físico y químico del suelo.....	21
2.5. Materiales	21
2.5.1. Material biológico	21
2.5.2. Tratamientos	23
2.6. Diseño experimental.....	24
2.7. Unidades experimentales.....	26
2.8. Análisis estadístico	26
2.9. Instalación y conducción del cultivo	27
2.9.1. Preparación del suelo.....	27
2.9.2. Estacado y demarcación del terreno	27
2.9.3. Surcado	27
2.9.4. Abonamiento	27
2.9.5. Siembra.....	28
2.9.6. Riego.....	28
2.9.7. Deshierbo aporque y aplicación de fitorremediadores	28
2.9.8. Cosecha.....	28
2.9.9. Almacén de Semillas	28
2.9.10. Evaluación de los parámetros de componentes de rendimiento	29
2.10. Metodología para estandarización molecular PCR	29
2.10.1. Extracción de ADN	30
2.10.2. PCR punto final	32
2.10.3. PCR tiempo real (qPCR)	34
CAPÍTULO III.....	37
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	37
3.1 Análisis molecular	37
3.1.1 Extracción de ADN por espectrofotometría y densitometría	37
3.1.2 Estandarización de PCR punto final con gradiente de temperaturas.....	39
3.1.3. Prueba de PCR tiempo real qPCR	42

3.2	Análisis agronómico	43
3.2.1.	Análisis de componentes de rendimiento	43
3.2.2.	Correlación de los parámetros cuantitativos de rendimiento	58
	CONCLUSIONES	60
	RECOMENDACIONES.....	61
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62
	ANEXOS	67

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1.1. <i>Patotipos identificados de Synchytrium endobioticum en Europa</i>	8
Tabla 1.2. <i>Lista de primers para identificar el gen Sen2</i>	15
Tabla 2.1. <i>Temperatura máxima, mínima, media, precipitación y balance hídrico correspondiente a la campaña agrícola 2023-2024 de la Estación Meteorológica INIA (SENAMHI)-Ayacucho</i>	20
Tabla 2.2. <i>Análisis de suelos de la parcela experimental ubicada en el Núcleo de Investigación y Producción de la Universidad de Huamanga (NIPUH).</i>	22
Tabla 2.3. <i>Datos de entrada de las colecciones de papa nativa del Laboratorio de Genética y Biotecnología Vegetal - UNSCH</i>	23
Tabla 2.4. <i>Lista de 64 tratamientos de papas nativas del banco de Germoplasma del Laboratorio de Genética y Biotecnología Vegetal de la UNSCH, Ayacucho. tratamientos y nivel de ploidia</i>	25
Tabla 2.5. <i>Características dimensionales de las parcelas experimentales ubicadas en Pampa del Arco, NIPUH</i>	27
Tabla 2.6. <i>Lista de primers para identificación de genes de resistencia a Synchytrium endobioticum</i>	33
Tabla 2.7. <i>Master mix para gen Sen2</i>	34
Tabla 3.1. <i>Resultados de cantidad (ng/uL) y calidad de ADN (A260/A280) por espectrofotometría</i>	39
Tabla 3.2. <i>Master mix para 1Rx evaluación de la presencia del gen Sen2</i>	40
Tabla 3.3. <i>Master mix 1Rx para segunda evaluación del gen Sen2</i>	42
Tabla 3.4. <i>Resultado de los valores Cq obtenido en 3 accesiones (T16, T30 y T63) de papa luego de PCR tiempo real (qPCR)</i>	43
Tabla 3.5. <i>Resultado del análisis de varianza (ANOVA) de los 5 parámetros de rendimiento en 64 accesiones de papas nativas, significación estadística de los cuadrados medios</i>	45
Tabla 3.6. <i>Comparación de medias DLS ($p < 0.05$) del Diámetro de follaje en 64 tratamientos (accesiones) de papas nativas</i>	46
Tabla 3.7. <i>Comparación de medias DLS ($p = 0.05$) del Altura de follajes en 64 tratamientos (accesiones) de papas nativas</i>	48
Tabla 3.8. <i>Comparación de medias DLS ($p < 0.05$) del número de tallos en 64 tratamientos (accesiones) de papas nativas</i>	51

Tabla 3.9.	<i>Comparación de medias DLS($p=0.05$) del número de tubérculos/mata en 64 tratamientos (accesiones) de papas nativas.....</i>	54
Tabla 3.10.	<i>Comparación de medias DLS($\alpha=0.05$) del rendimiento Kg/ha en 64 tratamientos (accesiones) de papas nativas.....</i>	57

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1.1. <i>Modelo estructural del ADN</i>	7
Figura 1.2. <i>Ciclo de vida de Synchytrium endobioticum</i>	9
Figura 1.3. <i>Distribución mundial de Synchytrium endobioticum</i>	9
Figura 1.4. <i>Curva de amplificación PCR tiempo real (qPCR)</i>	12
Figura 2.1. <i>Mapa de ubicación política y ubicación satelital del área experimental “NIPUH”</i>	18
Figura 2.2. <i>Temperatura máxima, mínima, media y balance hídrico correspondiente a la campaña agrícola 2023-2024 de la Estación Meteorológica de INIA (SENAMHI) – Ayacucho</i>	21
Figura 2.3. <i>Distribución de los 64 tratamientos de papas nativas en dos bloques con un diseño látice 8x8</i>	26
Figura 2.4. <i>Dimensiones de cada unidad experimental en el diseño látice simple 8x8</i>	27
Figura 2.5. <i>Flujo de trabajo de la evaluación molecular</i>	31
Figura 2.6. <i>Perfil térmico PCR punto final, para el gen Sen2</i>	35
Figura 2.7. <i>Perfil térmico qPCR y diseño de placa para gen Sen2</i>	36
Figura 2.8. <i>Flujograma de las actividades para la evaluación de análisis moleculares y componentes de rendimiento de 64 tratamientos de papa Solanum tuberosum</i>	37
Figura 3.1. <i>Resultados de calidad de ADN por densitometría</i>	40
Figura 3.2. <i>Diseño del perfil térmico y gradiente de temperatura para el gen Sen2</i>	41
Figura 3.3. <i>Foto-documentación de gradiente de temperatura PCR para gen Sen2</i>	41
Figura 3.4. <i>Diseño del perfil térmico para el gen Sen2</i>	42
Figura 3.5. <i>Segunda foto-documentación de producto PCR con temperatura de anillamiento a 60°C para gen Sen2</i>	42
Figura 3.6. <i>Curva de concentración de qPCR muestra 16a y 16b</i>	43
Figura 3.7. <i>Curva de concentración de qPCR muestra 30a y 30b</i>	44
Figura 3.8. <i>Curva de concentración de qPCR muestra 63a y 63b</i>	44
Figura 3.9. <i>Histograma de frecuencia de medias del parámetro diámetro de follaje, se muestran los 9 subgrupos (I al IX)</i>	47

Figura 3.10.	<i>Histograma de frecuencia de medias del parámetro Altura de planta, se muestran los 8 subgrupos (I al VIII)</i>	50
Figura 3.11.	<i>Histograma de frecuencia de medias del parámetro Número de tallos, se muestran los 7 subgrupos (I al VII).....</i>	52
Figura 3.12.	<i>Histograma de frecuencia de medias del parámetro número de tubérculos por mata, se muestran los VII subgrupos (I al VII)</i>	55
Figura 3.13.	<i>Histograma de frecuencia de medias del parámetro kilogramos por hectárea (kg/ha), se muestran los X subgrupos (I al X)</i>	58
Figura 3.14.	<i>Correlación de los 5 parámetros de rendimiento en 64 tratamientos de papas nativas</i>	59

ÍNDICE DE ANEXOS

	Pág.
Anexo 0.1 Datos cuantitativos de rendimiento de los 64 tratamientos de papas nativas, del germoplasma del laboratorio de Genética y Biotecnología Vegetal. ----	68
Anexo 0.2 Análisis de varianza ANOVA de los 5 parámetros cuantitativos en 64 accesiones de papas nativas con el diseño látice simple 8x8, usando Software Rstudio. -----	69
Anexo 0.3 Catálogo fotográfico de desarrollo de investigación etapa 1 Núcleo de Investigación de la Universidad de Huamanga (NIPUH). -----	70
Anexo 0.4 Catálogo fotográfico de desarrollo de investigación etapa 2 Laboratorio de Genética y Biotecnología Vegetal (LGBV) – UNSCH. -----	72

RESUMEN

Sen2 es el gen de resistencia de amplio espectro frente al *Synchytrium endobioticum*, agente causal de la verruga de la papa. Con el fin de manejar este problema mundial, se plantearon los siguientes objetivos: realizar el protocolo estandarizado de PCR para el gen *Sen2* que da resistencia a *Synchytrium endobioticum* y evaluar los componentes de rendimiento en accesiones de papas nativas cultivadas a 2756 m.s.n.m. se usó el diseño experimental látice simple 8x8 con dos bloques. El análisis de datos cuantitativos se realizó mediante ANOVA ($p<0.05$), correlación de los componentes del rendimiento con el programa Rstudio. El protocolo estandarizado de PCR punto final para el gen *Sen2* resultó: extracción de ADN por método CETAB 2X; el PCR (1Rx) contiene 3.76µl NFW; 4.0 µl de Buffer; 1.6 µl $MgCl_2$; 0.4 µl dNTPs; 3.0 µl F y R; 0.24 µl Taq polimerasa; 4.0 µl ADN [20ng/µl]; el perfil térmico Calentamiento: 93°C / 3'; Denaturación: 93°C / 4'; Annealing: 60°C / 45''; Extensión: 72°C / 1'30''; Extensión final: 72°C / 10' con 35 ciclos, observadas en gel de agarosa 1.8% de agarosa, teñido con 2.5 µl de BrEt, corridos en electroforesis (90V, 78A, 60''), y con el mismo perfil térmico para PCR tiempo real 1Rx de 10uL HiSYBR (Sybergreen) [1X]; 2uL primer F [10uM] y 2uL primer R [10uM] y 4uL ADN molde [A:20 ng/uL; B: 10 ng/uL]; 2uL NFW, completando el volumen total de 20uL. el rendimiento mínimo fue de 600.38 kg/ha hasta un máximo de 47571 kg/ha (T15 "Puka sawinto" y T63 "Yungay" respectivamente). Los componentes de rendimiento que más influyeron son diámetro de follaje ($r=0.2$)>altura de planta ($r=0.18$)>el número de tubérculos/mata ($r=0.16$)>peso de tubérculos kg/ha ($r=0.14$); los parámetros más correlacionados son número de tallos y tubérculos por mata ($r=0.93$), teniendo una relación directamente proporcional.

Palabras clave: *Synchytrium endobioticum*, protocolo PCR, gen *Sen2*, componentes de rendimiento, papas nativas.

INTRODUCCIÓN

El Chytridiomyceto *Synchytrium endobioticum* (Schilbersky) Percival, es el agente causal de la enfermedad denominada verruga de la papa (potato wart) (Obidiegwu et al., 2014), esta enfermedad es de la más devastadora a nivel mundial, generando altas pérdidas económicas (van de Vossenberg et al., 2022). La diseminación de la enfermedad se dio a través de la propagación asexual con semillas infectadas, llevadas de países andinos hacia el resto del mundo, adaptándose perfectamente y desarrollando nuevos patotipos. En la actualidad este patógeno es considerado la plaga cuarentenaria más importante del mundo, siendo clasificado en la categoría A2 por European and Mediterranean Plant Protection Organization, (EPPO) (2017) y la unión europea (UE) (Diario Oficial de la Unión Europea, 2022).

En 1896 Schilberszky reportó por primera vez la “verruca de la papa” en Hungría y en el Perú el encargado en reportar el patógeno fue Abbott en 1928, en aquel entonces con una incidencia de hasta un 20% (Torres, 2002). Hodgson 1974 citado por Obidiegwu et al. (2014) menciona que el control químico no es efectivo, las medidas tomadas fue el de desarrollar variedades resistentes. Hasta 1941 se conocía un solo patotipo de *S. endobioticum* (patotipo común, patotipo 1 o 1D1), la mayoría de variedades eran resistentes a este patotipo, desde esa fecha hasta el 2006 se identificó 30 patotipos nuevos (Obidiegwu et al., 2014), se consideran el 1(D1), 2(G1), 6(O1), 8(F1) y 18(T1) como los más importantes y ampliamente distribuida en Europa (Plich et al., 2018). No se reportan patotipos identificados en el Perú. La resistencia al patotipo común 1D1 ya no es efectiva actualmente en Europa y demás países donde se cultiva papa, además de ello la falta de rotación de cultivo favorece la propagación de los esporangios del hongo (Obidiegwu et al., 2014).

Actualmente *S. endobioticum* es considerado el patógeno cuarentenario más importante de la papa, motivando su inclusión en la lista de cuarentena A2 EPPO, (2017) provocando

altas pérdidas de rendimiento (estimaciones del 60% al 90%) y contaminación del suelo a largo plazo por más de 40 años (Plich et al., 2018 y Przetakiewicz, 2015).

El gen *Sen2* fue mapeado en el cromosoma XI de la papa, reporta resistencia contra 8 patotipos de *Synchytrium endobioticum* en Polonia, los patotipos recolectados fueron de los países mediterráneos y mayores productores de papa en Europa (Alemania, Polonia, Ucrania, Países bajos) (Plich et al., 2018).

La papa es el tercer cultivo más importante del mundo, cultivada en 159 países consumida por más de 1000 millones de personas en todo el mundo, contribuye a la seguridad alimentaria y al empleo de la población rural y urbana (FAO, 2024). Es el sustento de 700 000 agricultores peruanos, la mayoría pequeños agricultores (International Potato Center (CIP), 2022). Perú tuvo un incremento de producción de papa en un 16.7%; Ayacucho incrementó en 61.2%, a nivel nacional se registró 607 901 toneladas reportada en el último censo realizada por el INEI-ENAGRO (Gob.pe, 2024). Ayacucho es una región considerada productora de papa, principalmente de las variedades Canchan, Yungay, Mariva, Peruanita, Amarilla Tumbay y Wayro, representando el 80% de producción total de papa en la región ayacuchana; los agricultores de esta región y otras regiones del país reportaron (<https://latinanoticias.pe/regiones/esta-es-la-peor-enfermedad-que-puede-atacar-a-la-papa-en-el-peru>) que la verruga de la papa causada por *Synchytrium endobioticum* les genera pérdidas económicas importantes. No se tiene cuantificado el efecto negativo de *Synchytrium endobioticum* en el rendimiento de este cultivo.

Un suelo infestado con *Synchytrium endobioticum* deja de ser útil para variedades comerciales susceptibles (Yungay), perjudicando así a los agricultores de papa y poniendo en riesgo la seguridad alimentaria; por lo cual es importante hacer investigaciones buscando seleccionar accesiones de papas nativas portadoras del gen de resistencia *Sen2*; debido a que el tratamiento químico no es eficiente, es contaminante del medio ambiente, deja residuos tóxicos en el suelo y deteriora la calidad del suelo (Plich et al., 2018 y Przetakiewicz, 2015).

Por lo cual el problema identificado es: ¿Cuál es el protocolo estandarizado de PCR para el gen *Sen2* que da resistencia a *Synchytrium endobioticum* y cuáles son los componentes de rendimiento en accesiones de papas nativas cultivadas en Ayacucho a 2756 m.s.n.m?

El presente trabajo pretende contribuir en la solución de dicho problema, debido que en la región de Ayacucho no existe investigaciones que reporten variedades resistentes a *Synchytrium endobioticum*, ya que este hongo es reportado como el patógeno cuarentenario más importante del mundo donde se cultiva la papa (Plich et al., 2018). Considerando los antecedentes del uso de variedades resistentes para el manejo y control de esta enfermedad, herramientas biotecnológicas y selección molecular, se podría ayudar a identificar accesiones de papas nativas portadoras de los genes de resistencia a *Synchytrium endobioticum* (*Sen2*) (Gabriel et al., 2016). En un futuro próximo, con estos conocimientos, se podría desarrollar un nuevo programa de mejoramiento genético molecular y biotecnológico para el cultivo de la papa; también se podría crear una nueva variedad de papa, con resistencia a *Synchytrium endobioticum* y que tenga altos rendimientos. Los resultados del presente trabajo de investigación también servirán para crear políticas de bioseguridad gubernamental frente a este patógeno.

Por lo ante dicho, el objetivo general fue elaborar protocolos para el análisis molecular orientados a identificar la presencia de genes de resistencia a *Synchytrium endobioticum* en el germoplasma de papa de la región de Ayacucho y determinar los valores relacionados a los componentes de rendimiento en accesiones de papas nativas cultivadas a 2756 m.s.n.m

Objetivos específicos

1. Estandarizar el protocolo molecular (PCR) para el gen *Sen2* que da resistencia a la papa contra el *Synchytrium endobioticum* en condiciones del Laboratorio de Genética y Biotecnología Vegetal (LGBV) - UNSCH.
2. Determinar los valores de componentes de rendimiento (cuantitativos) en 64 accesiones de papas nativas cultivadas a 2756 m.s.n.m.

CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO

1.1. Generalidades de la papa

El cultivo de papa tiene origen Andino (Perú, Bolivia) específicamente alrededor del lago Titicaca, fue cultivada hace 7000 años (Centro Internacional de la Papa (CIP), 2006); el Ministerio de Agricultura y Riego (MINAGRI) (2017), menciona que su posible domesticación fue hace 10000 años, mientras que la FAO (2024) menciona que fue hace 8000 años, siendo *Solanum Stenotomum* la primera registrada (CIP, 2006). La distribución de la papa cultivada es desde el norte de Venezuela hasta el centro de Chile y Argentina (CIP, 2022). Los mayores productores de papa son China, Rusia, India, EE. UU y Ucrania, haciendo un volumen de 160 millones de toneladas, (FAO, 2008).

La papa es considerada el tercer alimento más importante del mundo, existe más de 6000 variedades de papas nativas (Lutaladio & FAO, 2009), dulces (*Solanum tuberosum*. sub especie *andigena* y *S. stenotomum*); amargas (*Solanum juzepczukii* y *S. curtilobum* y *S. ajanhuiri* y especies Silvestres) (Cahuana & Arcos, 2002).

1.2. Papas nativas

Se las conoce como nativas porque tienen origen en los andes, a 3500 m.s.n.m (FAO, 2008). En el Perú se conocen más de 4000 especies de papas cultivadas (amargas y dulces), dentro de las especies cultivadas se encuentra las variedades nativas (MINAGRI, 2017). Huamán (1983) citado por Cahuana & Arcos (2002) mencionan que las papas nativas fueron constituidas de forma natural, a partir de especies silvestres diploides y la diversa polinización, la propagación de los tubérculos en forma vegetativa, la selección humana y natural, hizo posible que se perpetuaran las variedades actuales (FAO, 2008).

Por el contenido de glicoalcaloides (solanina, chaconina y levels) Cahuana & Arcos (2002) clasificaron a las papas nativas en dulces (menor a 20mg de glicoalcaloides en

100g de peso fresco de papas) y amargas (mayor a 20mg de glicoalcaloides en 100g de peso fresco de papas) cultivadas en regiones de condiciones más frías, como Puno, Huancavelica, Junín, ejemplo el híbrido de la primera generación *Solanum juzepczukii* (3X) es tolerante a las heladas, pero susceptibles a la verruga de la papa (*Synchytrium endobioticum*) y a sequías, *Solanum curtilobum* híbrido de segunda generación, también susceptible a la verruga de la papa.

1.3. Ploidia

La Ploidia viene a ser el número de juegos de los cromosomas, ejemplo diploide significa que tiene dos pares de cromosomas n de la madre (cromosomas sexuales femenino) y n del padre (cromosoma sexual masculino) (Calcaterra, 2005), Tirado et al., (2018) menciona que la papa es una especie poliploide (2x, 3x, 4x, 5x) con $n=12$, $2n$ es los juegos cromosómicos de la célula somática; ambos cromosomas homólogos, estos cromosomas tienen información para los mismos genes, comparten la ubicación del locus, con secuencias de bases nitrogenadas diferentes, llegándose a expresar los genes dominantes. (Cañón, 2012). Sánchez (2017) menciona que no existe relación alguna entre el número de cromosomas y la complejidad evolutiva, tampoco entre los números de cromosomas y la cantidad de ADN.

El número de cromosomas y el nivel de Ploidia son importantes, para estudiar especies y caracterizar germoplasmas y aclarar el origen de los nuevos híbridos y variedades cultivadas (Cañón, 2012). Para estimar el número de cromosomas existe métodos directos e indirectos (cantidad de ADN, observación de cromosomas bajo el microscopio) (Valladolid et al., 2014). Por su parte Sánchez (2017) menciona que también existe otras metodologías, como el conteo de cloroplastos en las células estomáticas, estas muestras se analizan en microscopio con un aumento de 10x y 40x.

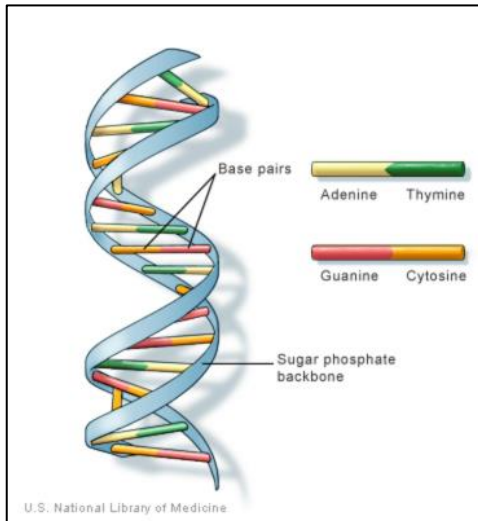
1.4. Acido desoxirribonucleico, ADN

Acido desoxirribonucleico o ADN, es el material que contiene los códigos o información de herencia “genes” (Sánchez, 2017), la mayor parte del ADN es nuclear y poca cantidad en las mitocondrias (Calcaterra, 2005), el ADN está compuesta por 4 bases nitrogenadas: adenina (A), guanina (G), timina (T) y citocina (C), emparejándose A con T y C con G y viceversa, estructuralmente cada base está unida a una molécula de azúcar y un grupo fosfato; juntas llamadas nucleótido; estos nucleótidos están distribuidos en una cadena de

doble hélice antiparalela, una propiedad importante del ADN es la replicación (Cañón, 2012).

Figura 1.1

Modelo estructural del ADN.



Fuente: Cañón (2012)

1.4.1. Gen

A partir de las hipótesis de Mendel, se planteó la existencia de factores hereditables, posteriormente conocidas como genes, que se encuentran a lo largo de todo el genoma (Cañón, 2012). En 1953 Watson y Crick propusieron que el ADN es una hélice de doble cadena de desoxirribonucleicos (Calcaterra, 2005). El gen es la unidad física y funcional de la herencia; los genes son secuencias de nucleótidos agrupados, en términos generales es ADN, algunos genes forman proteínas y otros no (Calcaterra, 2005). La genética dio un paso importante con el proyecto del genoma humano, (Kornblihtt, 2015), todos los seres vivos están compuestos por células, la información genética está contenida en el ADN (nuclear, mitocondrial y ribosomal). El conjunto de genes de todo el organismo se llama genoma (Cañón, 2012).

1.4.2. Gen *Sen2*

El gen *Sen2* se encuentra ubicado en un locus distinto de *Sen1* (gen común de resistencia a verruga de la papa), Plich et al. (2018) identificó el gen *Sen2* en el cromosoma XI de la papa usando marcadores DArTseq, este gen confiere resistencia de amplio espectro contra 8 patotipos de *Synchytrium endobioticum*: 1(D1), 2(G1), 6(O1), 8(F1), 18(T1), 2(Ch1),

3(M1) y 39(P1), distribuidos ampliamente en Europa y en Canadá los patotipos 6(O1), 1(D1) y 2(G1) (Andersen et al., 2021), como se muestra en el cuadro siguiente.

Tabla 1.1

Patotipos identificados de Synchytrium endobioticum en Europa.

Patotipo	Aislamiento	País
1(D1)	#1/2017/D1	Alemania
2(G1)	#4/2005/G1	Alemania
2(Ch1)	#2/2005/Ch1	Polonia
3(M1)	#2/2005/M1	Polonia
6(O1)	#1/2007/O1	Alemania
8(F1)	#3/2005/F1	Países bajos
18(T1)	#27/2009/T1	Alemania
39(P1)	#PL69/2009	Polonia

Fuente: Plich et al. 2018.

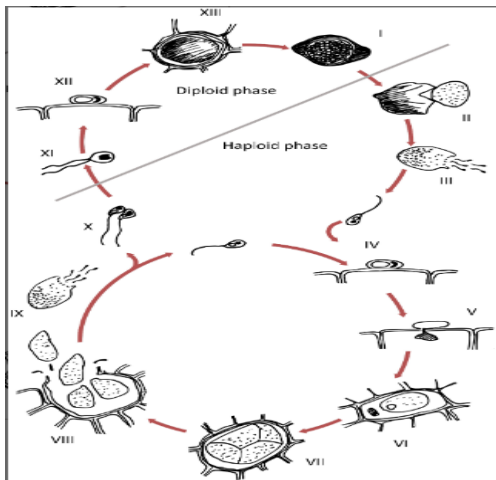
1.5. *Synchytrium endobioticum*

Obidiegwu et al. (2014) afirma que la verruga de la papa es actualmente el patógeno cuarentenario más importante del mundo donde se cultiva papa, causada por el hongo biotrófico obligado (quitrido) *Synchytrium endobioticum* (van de Vossenbergh et al., 2022a). Plich et al. (2018) analizó la resistencia de 176 clones de papa con el método Glynne-Lemmerzähl modificado, demostrando que el gen *Sen2* es un gen mayor que confiere resistencia contra 8 patotipos de *Synchytrium endobioticum*.

S. endobioticum, como se muestra en la Figura 1.2 se caracteriza por presentar zoosporas (esporas flageladas) móviles y ausencia de hifas, las esporas en reposo funcionan como prosoro (una vesícula en la que se forman los esporangios) (van de Vossenbergh et al., 2022b).

Figura 1.2

Ciclo de vida de Synchytrium endobioticum.

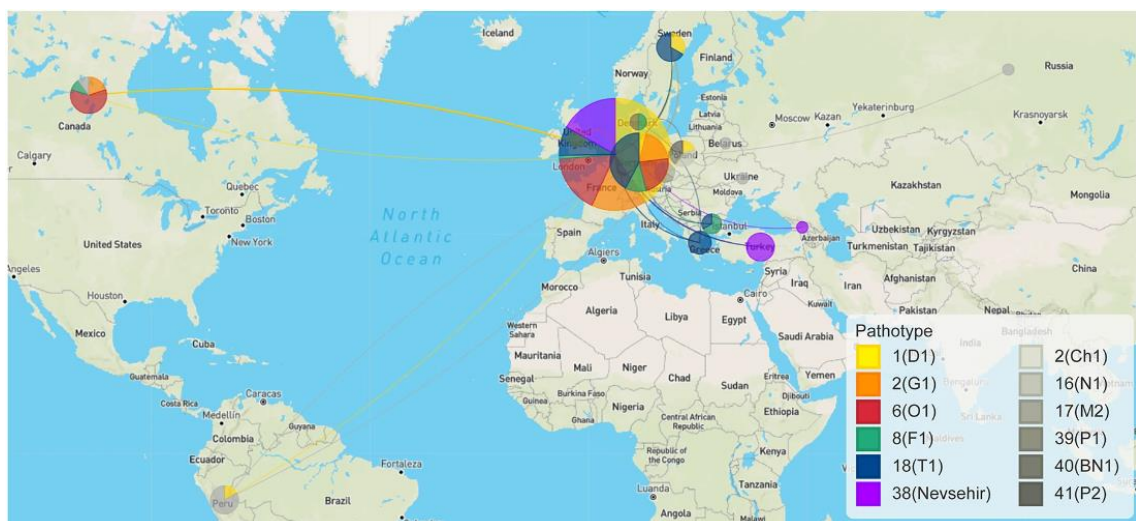


Fuente: Van de Vossenberg et al. 2022.

El ciclo de vida largo de *S. endobioticum* se basa en las observaciones de Curtis (1921) y Kole (1965). I, esporas en reposo = prosoro; II, germinación de esporas en reposo y liberación de soros; III, liberación de zoosporas; IV, enquistamiento; V, penetración de la pared celular huésped; VI, desarrollo de talo o prosoro fúngico; VII, esporangio con múltiples zoosporangios: espora de verano; VIII, ruptura de la célula huésped y liberación de zoosporangios; IX, liberación de zoosporas de soros; X, plasmogamia: fusión de isogametos; XI, cariogamia: cigoto (sensu Curtis); XII, enquistamiento e infección del huésped por cigoto; y XIII, desarrollo de esporas en reposo (van de Vossenberg et al., 2022).

Figura 1.3

Distribución mundial de S. endobioticum.



Fuente: van de Vossenberg et al. 2019, 2024

1.5.1. Taxonomía *Synchytrium endobioticum*

En 2018, van de Vossenberg et al., secuenciaron el ADNr 18S de *Synchytrium endobioticum*, donde realizaron un estudio genómico y filogenético de máxima verosimilitud de 47 aislamientos fúngicos basada en una alineación de 54 485 aminoácidos extraídos de 192 genes. Transfieren a *S. endobioticum* a la familia Synchitriaceae del orden Synchytriales, perteneciente a la clase Chytridiomycetes que se encuentra en la división Chytridiomycota del reino de los Hongos (van de Vossenberg et al., 2019, 2024)

1.5.2. Epidemiología

La distribución de la enfermedad verrugosa empezó en la zona andina (Perú - Bolivia) (van de Vossenberg et al., 2024). Debido a la falta de alimentos en Europa a causa de la guerra (anglo-afgana) que se vivía en esa época, se llevó papas infectadas con el inoculo, posteriormente desarrollándose y adaptándose (Muñoz, 2024; van de Vossenberg et al., 2019). En 1887 Schilberszky recibió una muestra de tubérculos con verruga provenientes de la República de Eslovenia, ya en 1896 se reportó la enfermedad a nivel mundial (América latina, Europa, Norte América, Asia, África y Oceanía) como patógeno cuarentenario, para eso ya se había trasladado tubérculos infectados por todo el mundo (Obidiegwu et al., 2014. Van de Vossenberg et al., 2022).

Actualmente está registrado en la lista de plagas cuarentenarias A2 de la EPPO, no existe control químico que no deje infértil un suelo, el principal contaminante agrícola es el suelo y la semilla, no existe reportes científicos en el Perú, solo reportes por el INIA en 2017 donde menciona variedades resistentes, basándose en la expresión fenotípica (Cahuana & Arcos, 2002).

En el Perú y la región Ayacucho, la enfermedad prospera en zonas frías en temperaturas de 12-24°C, con variaciones de pH entre 3.9 – 9.5 (Torres, 2002). Los órganos afectados son los ojos, los brotes, las hojas y las inflorescencias; sin embargo, la raíz parece presentar inmunidad (Van de Vossenberg et al., 2022). El hongo infecta las células meristemáticas de la planta de papa, para ello debe haber una película de agua, por donde se moverá la zoospora para infectar la célula, causando hipertrofia e hiperplasia celular (Van de Vossenberg et al., 2022 y Torres, 2002).

1.6. Reacción en cadena de la polimerasa, PCR punto final

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una reacción enzimática que amplifica millones de veces una secuencia específica de ADN (generalmente regiones codificantes), durante varios ciclos, usando a la enzima ADN polimerasa como sintetizador del ADN (Tamay de Dios et al., 2013).

Los elementos importantes en la reacción son: ADN molde, la enzima polimerasa, los oligo - nucleótidos o primers (Forward y Reverse), los desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTPs: A, T, G y C) el ion magnesio (ClMg^+), una solución amortiguadora o buffer y agua libre de nucleasas o NFW. Preparando así un mix de PCR, para realizar el segundo paso, Crear el perfil térmico, con las 3 etapas principales: desnaturalización, hibridación y extensión; el producto final del PCR, los amplicones son visualizados a través de una electroforesis en geles de agarosa (Tamay de Dios et al., 2013).

1.6.1. Electroforesis

Los amplicones son visualizados a través de una electroforesis en geles de agarosa, la electroforesis consiste en la separación de moléculas grandes de ácidos nucleicos a través de una matriz sólida conocida como gel de agarosa o poliacrilamida, que funciona como filtro para separar moléculas en un campo eléctrico de acuerdo a su tamaño y carga, ejemplo 1% poros del gel de agarosa grandes, 2% poros más pequeños, esta separación se hace en TBE o TAE, al gel se le agrega bromuro de etidio, el cual es una molécula capaz de unirse a la doble cadena del ADN, cuando se expone el gel a UV, el bromuro se excita y emite señal, el cual permite visualizar amplicones en forma de banda (Fierro, 2019 y Tamay de Dios et al., 2013).

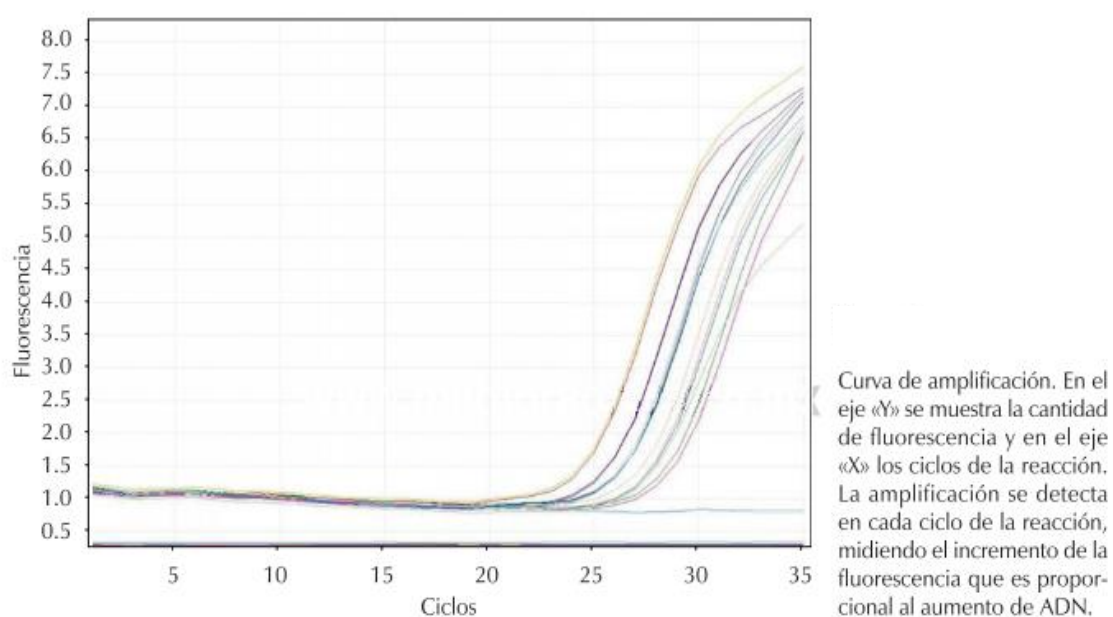
1.7. PCR tiempo real (qPCR)

Una forma reciente para detectar y cuantificar el ADN es el PCR en tiempo real, El término en tiempo real se refiere a que la detección de los productos implicados sucede en cada ciclo de la reacción, y también cuantifica la cantidad de ADN de la muestra (van de Vossenberget al., 2022), el producto del amplicon es monitoreada conforme transcurre la reacción PCR en tiempo real, los reactivos son los mismos utilizados en la PCR punto final, sólo que los elementos de la reacción vienen juntos en un master mix, el agua es proporcionada por separado y también es libre de nucleasas (Tamay de Dios et al., 2013). Los primers deben ser diseñados especialmente para garantizar una alta especificidad y

para que generen amplicones de un tamaño que oscile entre 100-150 pb; si éstos son más grandes, la eficiencia de la reacción disminuye considerablemente, por ello se recomienda diseñar los primers para evitar estos problemas. En este PCR se usan sistemas basados en fluorescencia, que es emitida y capturada en la etapa de extensión, el reportero más usado es el SYBR Green, aunque tiene errores, por ello diversos laboratorios realizan una curva de meting o curva de disociación (Tamay de Dios et al., 2013).

Figura 1.4

Curva de amplificación PCR tiempo real (qPCR).



Fuente: Tamay de Dios et al. (2013)

1.8. Componentes de rendimiento

Huamán (1998) citado por Misarayme (2018) y Muñoz (2024) evaluaron 5 parámetros cuantitativos de rendimiento, altura de planta, número de tallos por planta, número de tubérculos por planta, diámetro de follaje y peso de tubérculos/mata, ya que estos parámetros se demostraron que tienen influencia en el rendimiento.

1.9. Medioambiente (A)

El factor ambiental (A) es determinante para el cultivo de papa y todo el entorno biótico, ya que hay influencia en diversos factores, como la intensidad de luz, las horas luz, las horas frío, las variedades tienen exigencias propias (Misarayme, 2018).

El medio ambiente más el genotipo interactúan para que se exprese el fenotipo (F) de los seres vivos, por ejemplo, una accesión de papa nativa que tiene genes para que sea de pulpa arenoso, lo expresa mejor a 3500 m.s.n.m, que la misma accesión sembrada a menor altura 2700m.s.n.m, aunque sus características externas sean iguales, debido al efecto ambiental (Remón & Peña, 2018).

1.10. Fenotipo (F)

Al conjunto de información genética de un individuo se le conoce como genotipo (G), cuando éste interacciona con el medio ambiente, expresara características peculiares observables, conocida como fenotipo (Kornblihtt, 2015).

La relación GXA, analiza el comportamiento relativo diferencial que exhiben los genotipos cuando se les somete a diferentes ambientes. Por tanto, los cambios que surgen en el ordenamiento de los cultivares al cambiar de un ambiente a otro indican la presencia de GXA y la ausencia de estabilidad para el carácter en cuestión, como resultado de estos cambios un genotipo es capaz de producir varios fenotipos y reducir la correlación entre genotipo y fenotipo (Colunche, 2014 y Tirado et al., 2018).

1.11. Antecedentes relacionados al análisis molecular para el gen *Sen2*

Los trabajos base para la identificación de genes resistentes a la verruga de la papa, inicio con Hehl et al. (1999) donde estudió el vínculo que había en un homólogo del gen N de resistencia a TMV en el tabaco frente a la resistencia a *Synchytrium endobioticum*. En la investigación identificaron que el gen *Sen1* se localizaba en el cromosoma XI de la papa y estaba localizada en una región genómica que está relacionado con el segmento del genoma del tabaco que alberga el gen N. Brugmans et al. (2006) desarrolló un mapa de ligamiento para ubicar un gen de resistencia a la enfermedad de las verrugas, utilizó los marcadores AFLP, identificando el locus en el brazo largo del cromosoma 4, y se llamó *Sen 1-4* en contraste con el gen *Sen1* del cromosoma 11. Przetakiewicz (2015), realizó una investigación en un campo infectado 43 años después del registro del patógeno (no se cultivó papa durante ese periodo), allí identificaron que los esporangios se encontraban viables, realizaron una prueba de Potoček para probar la infectividad. En este estudio realizado en Polonia se identificó 2 patotipos virulentos 1(D1) y 3(M1), el primero el más distribuido en Europa, y el ultimo local. En 2018 Plich et al., identificaron el gen *Sen2*, situado en el cromosoma XI, pero en un locus distinto del *Sen1*. *Sen2* proporciona

resistencia de amplio espectro contra ocho patotipos de verrugas reportadas por la EPPO (2017). Plich et al. (2018), en sus resultados encontró que el clon parental DG 97-264 era extremadamente resistente a *S. endobioticum*. Usaron marcadores DArTseq para ubicar el gen *Sen2*. Yan et al. (2022) en su investigación llamada “Integrative Analysis of Genes Involved in the Global Response to Potato Wart Formation”, realizó un estudio transcriptómico para realizar un análisis integrativo de genes involucrados con *Synchytrium endobioticum* detectando 5052 genes expresados diferencialmente (DEG) y combinó con redes de coexpresión genética (GCN), citando a Plich et al. (2018) como pioneros en la mejora genética y respuestas frente al *Synchytrium endobioticum*.

1.11.1 Extracción de ADN de papa

Para la extracción del ADN, Plich et al. (2018), utilizó el kit GenElute Plant Genomic DNA Miniprep (Sigma-Aldrich, Alemania), para ello congeló hojas con N líquido. También usada por Rogozina et al. (2019) y Obidiegwu et al. (2014).

Gabriel et al. (2016) usó el protocolo CTAB2X, donde colectó folíolos tiernos y sanos, refrigeró a -20°C, luego fueron molidas en N líquido (-195°C), usando 100mg para la extracción de ADN genómico.

1.11.2. Marcadores moleculares para el gen *Sen2*

Para encontrar los marcadores de PCR, Plich et al. (2018), usaron marcadores DArTseq, cercanos al locus de resistencia *Sen2*: 12461274ch11, usaron la secuencia del genoma de la papa de referencia, DM1-3(v.4.03) reportada por Xu et al., (2011). los cebadores de PCR se diseñaron usando el programa Primer3, usando el marcador BCH como control positivo. El volumen de reacción fue de 20µL. Encontró en 80 individuos, los marcadores 5450_3; 2502_1 y 2502_3 resistentes a 8 patotipos, para el gen *Sen1* se usó marcadores NL25 (Obidiegwu et al., 2014).

1.11.3. Los cebadores (primer)

Tabla 2.2

Lista de primers para identificar el gen *Sen2*.

Marker	Sequence	Name of the source sequence and position in the DM1-3 v4.03 reference genome (bp)	T ¹ (°C)	Product size (bp)	References
N125 F N125 R	TATTGTTAATCGTTACTCCCTC AGAGTCGTTTTACCGACTCC	PGSC0003DM60401015682 chr11:1804775..1808184	58	~1400	Gebhardt et al. 2006
N127 F N127 R	TAGAGAGCATTAGAAGCTGC TTTTGCCTACTCCCGCATG	PGSC0003DM60403016979 chr11:1340332..1347110 or PGSC0003DM60400000889 chr11:11188091..11188558	58	~1200	Marczewski et al. 2001
1251_3 F 1251_3 R	TGGAGAAACCATCCAATTCC GACGAAGGGGTGTCTCTTGA	12448821chr11 chr11:33684487..33684554	60	~1300 ²	This study
2502_1 F 2502_1 R	GCAGAGTTTCCACTGCTTCA TGATTGCAAAATCAACCACTATG	12461274chr11 chr11:35055625..35055693	60	~290	This study
2502_3 F 2502_3 R	CCAACTCCACAACCTTTTGTCT CCAACTGATCGAAATCAAC	12461274chr11 chr11:35055625..35055693	60	~1500	This study
5480_3 F 5480_3 R	ATGATCATTGATGGCAGCAG GGGCATTTTGGAGCATAAAA	3728961chr11 chr11:34894172..34894240 or chr11:34934800..34934868	58	~1046	This study
3334_3 F 3334_3 R	GCACCAAGTTCGGATATGCT GGGGCCACCAATAAAAAGAT	PGSC0003DM60400033334 ³ chr11:37644263..37650835	58	~1408	This study
CL80_1 F CL80_3 R	TTTGAAGCGAAGTGAGGTGC AAGACTTTCGGTGCCATGTG	RDC0001NLR0272 ¹ chr11:35554214..35558468	58	~1159 ²	This study
BCH F BCH R	CATGACATAGTTTGAATTTGAGTC CGTTTGGCGCTGCCGTAAGTT	PGSC0003DM60400010169 chr03:43936158..43938595	58/60	~300	Milczarek et al. 2012

Fuente: Plich et al. (2018)

1.11.4. Reacción en cadena de polimerasa (PCR) para el gen *Sen2*

Plich et al. (2018) usaron un PCR para el gen *Sen2* que contenía en un volumen de reacción de 20µL de mix con: 0,06 U/ µl de ADN polimerasa DreamTaq (Thermo Scientific), 0,2 mM de cada dNTP, 2 mM de MgCl₂, cebadores (1–2 µl de 10 µM solución), ADN molde (1 ng/µl), agua (hasta 20 µl)) con el uso del programa termociclador: 93 °C—3 min., 35 × (93 °C—2 min, 58 o 60 °C—45 s, 72 °C-1,5 min), 72 °C-10 min) protocolo usado también por Rogozina et al. (2019) y Van de Vossenberg et al. (2022).

1.11.5. Electroforesis para el gen *Sen2*

En los resultados, Plich et al. (2018) preparó un gel de agarosa al 1-2% teñido con bromuro de etidio. En el estudio realizado, identificó al clon resistente DG 97-264, el cual es un híbrido complejo de las especies (*S. tuberosum*, *S. chacoense*, *S. yungasense*, *S. gourlayi*, *S. acaule*, *S. demissum*, *S. verrucosum*, *S. microdontum*, *S. phureja*).

1.12. Antecedentes de Componentes de rendimiento de papas

En la tesis nombrada Evaluación morfológica y rendimiento de diez accesiones de papa nativa (*Solanum spp*), a 4300 m.s.n.m. Vinchos – Ayacucho – 2016, Misarayme (2018) evaluó 4 parámetros cuantitativos en la papa (altura de planta, número de tallos por planta,

diámetro de follaje y numero de tubérculos por planta). Por su parte Martin & Jeréz, (1979) en su investigación llamada Performance evaluation of potato (*Solanum tuberosum* L.) Behavior AS temperaturas, evaluaron el componente de rendimiento por planta o mata en kg/ha. estos parámetros para la evaluación de papas nativas en Puno y Junín tambien fueron usados por el MINAGRI (2017), Muñoz, (2024) en su investigación llamada caracterización y selección molecular de papas nativas (*Solanum spp.*) con genes para resistencia a *Phytophthora infestans*, tambien evaluó 5 parámetros de rendimiento.

CAPÍTULO II

METODOLOGÍA

2.1. Lugar del experimento

2.1.1. Ubicación política

Departamento : Ayacucho
Provincia : Huamanga
Distrito : Ayacucho

2.1.2. Ubicación geográfica

1° etapa: Núcleo de investigación y Producción de la Universidad de Huamanga (NIPUH)

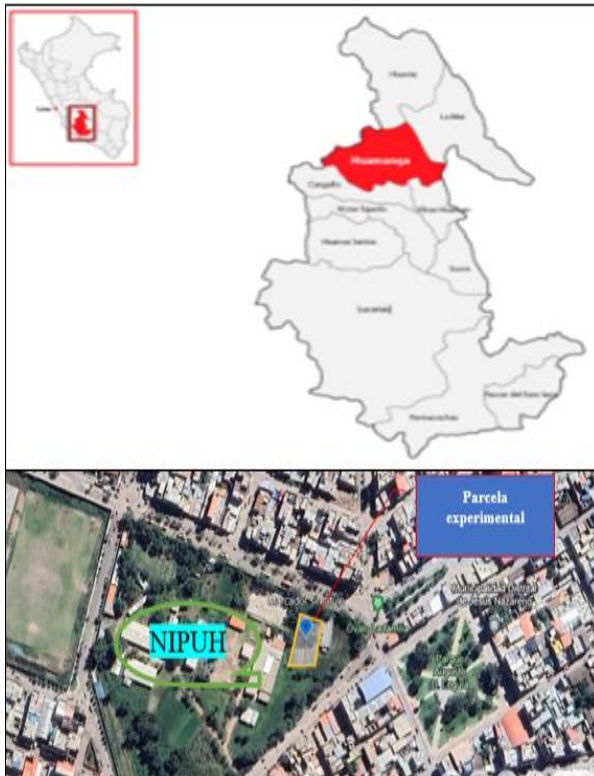
Latitud : 13°09'19''S
Longitud : 74°13'08W''
Altitud : 2756 m.s.n.m

2° Etapa: Laboratorio de Genética y Biotecnología Vegetal (LGBV) de la Escuela Profesional de Agronomía de la Universidad Nacional San Cristóbal de Huamanga (UNSCH).

Latitud : 13°08'43''S
Longitud : 74°13'18W''
Altitud : 2788 m.s.n.m

Figura 2.1

Mapa de ubicación política y ubicación satelital del área experimental “NIPUH”.



Fuente: Google Earth

En el NIPUH, se instaló del germoplasma de papas nativas (1ra etapa), con una tecnología estándar, producción convencional en condiciones de campo, se obtuvo material biológico y se evaluó parámetros de rendimiento.

La segunda etapa se realizó en el Laboratorio de Genética y Biotecnología Vegetal (LGBV) de la Escuela Profesional de Agronomía (EPA) de la UNSCH, se hizo una colecta de material genético (hojas tiernas) para extracción de ADN, se compró primers (5450_3; 2502_1; 2502_3; NL25) específicos para genes de resistencia a *Synchytrium endobioticum*, con estos marcadores moleculares se procedió a estandarizar el PCR convencional (con gradiente de temperatura) y por PCR tiempo real (qPCR), para el gen *Sen2* resistente a *Synchytrium endobioticum*.

2.2. Antecedentes del terreno

El terreno designado para instalar el germoplasma de papa, descansó durante 2 años, estuvo sembrado con alfalfa, capa arable de 20 – 50cm y tiene una pendiente de 5%; anteriormente se cultivó papa, para obtención de semilla básica hace 10 años.

2.3. Condiciones climáticas

Los datos meteorológicos que reporta la Estación Meteorológica INIA-Canaán (Ayacucho) en la campaña 2023-2024, estos datos se emplearon para el cálculo del balance hídrico, que se muestran en la Tabla 2.3 y Figura 2.1. Durante el periodo señalado, la cantidad total de precipitación alcanzó los 493.5 mm, mientras que las temperaturas máxima, mínima y media anuales fueron de 27.7 °C, 6.1 °C y 17.2 °C, respectivamente. Según el balance hídrico, se identificaron condiciones de humedad durante los meses de diciembre, enero, febrero y marzo del 2024, mientras que se registró un déficit de humedad en los meses de abril hasta noviembre del 2023.

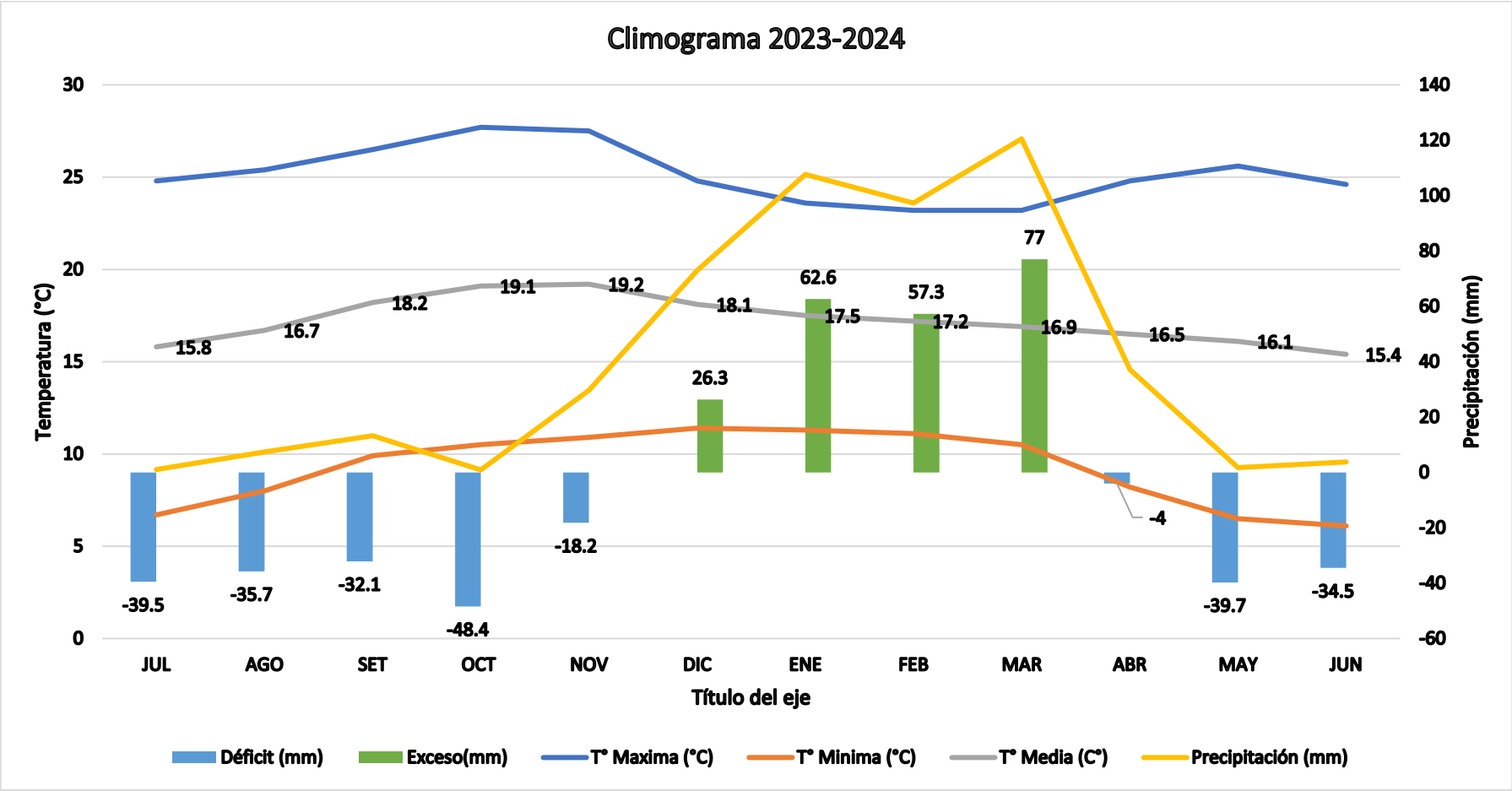
Tabla 2.1

Temperatura máxima, mínima, media, precipitación y balance hídrico correspondiente a la campaña agrícola 2023-2024 de la Estación Meteorológica INIA (SENAMHI)-Ayacucho.

Distrito	: Ayacucho	Altitud	: 2735 msnm
Provincia	: Huamanga	Latitud	: 13°10'0.06''
Departamento	: Ayacucho	Longitud	: 74°12'22.92''

AÑO	2023						2024					
MESES	JUL	AGO	SET	OCT	NOV	DIC	ENE	FEB	MAR	ABR	MAY	JUN
T° Máxima (°C)	24.8	25.4	26.5	27.7	27.5	24.8	23.6	23.2	23.2	24.8	25.6	24.6
T° Mínima (°C)	6.7	8	9.9	10.5	10.9	11.4	11.3	11.1	10.5	8.2	6.5	6.1
T° Media (°C)	15.8	16.7	18.2	19.1	19.2	18.1	17.5	17.2	16.9	16.5	16.1	15.4
Factor	4.96	4.96	4.8	4.96	4.8	4.96	4.96	4.48	4.96	4.8	4.96	4.8
ETP (mm)	78.1	82.8	87.4	94.7	92.2	89.8	86.6	76.8	83.6	79.2	79.6	73.7
Precipitación (mm)	1.1	7.4	13.3	0.9	29.7	73	107.6	97.3	120.5	37.2	1.7	3.8
ETP Ajust. (mm)	40.6	43.1	45.4	49.3	47.9	46.7	45	40	43.5	41.2	41.4	38.3
H del suelo (mm)	-39.5	-35.7	-32.1	-48.4	-18.2	26.3	62.6	57.3	77	-4	-39.7	-34.5
Déficit (mm)	-39.5	-35.7	-32.1	-48.4	-18.2					-4	-39.7	-34.5
Exceso(mm)						26.3	62.6	57.3	77			

Figura 2.2
Temperatura máxima, mínima, media y balance hídrico correspondiente a la campaña agrícola 2023-2024 de la Estación Meteorológica de INIA (SENAMHI) – Ayacucho.



2.4. Análisis físico y químico del suelo

Para determinar las características físico químico de la parcela experimental, se realizó análisis edáfico en el Laboratorio de suelos, planta, agua y fertilizantes del programa de investigación en Pastos y Ganadería de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga.

Se tomó muestras de suelo mediante el método convencional en zig zag, a una profundidad de 15 cm. Posteriormente, las muestras fueron combinadas y divididas en 4 partes iguales para obtener una muestra homogénea de un kilogramo (kg). El resultado se muestra en la tabla 2.2. Caracterizando al suelo como franco arenoso, ligeramente salino con bajo % M.O.

Tabla 2.2

Análisis de suelos de la parcela experimental ubicada en el Núcleo de Investigación y Producción de la universidad de Huamanga (NIPUH).

Descripción	Variables	Unidad	Interpretación
pH	8.32		moderadamente alcalino
C.E.	0.66	dS/m	muy ligeramente salino
CaCO ₃	0.5	%	bajo
MO	0.99	%	muy bajo
P	14.4	ppm	Medio
K	174.6	ppm	Alto
CICe	22.8	Cmol(+)/kg	Medio
Nt	0.05	%	bajo
Textura	Fr.Ar		Franco arenoso
Cationes cambiables			
Ca ⁺⁺	6.72	Cmol(+)/kg	Medio
Mg ⁺⁺	4.88	Cmol(+)/kg	Alto
K ⁺	0.9	Cmol(+)/kg	Alto
Na ⁺	0.74	Cmol(+)/kg	Muy alto

2.5. Materiales

2.5.1. Material biológico

Estuvo conformado por 64 accesiones de papas (60 nativas, 3 mejoradas “Yungay, Canchan y Mariva” y 1 silvestre “Atuqpa papan”), del banco de germoplasma del

Laboratorio de Genética y Biotecnología Vegetal (LGBV - UNSCH). Los datos pasaporte se muestran en la Tabla 2.3. Las accesiones fueron lavadas, desinfectadas y almacenadas, hasta alcanzar la longitud de brote óptimas para ser sembradas en las parcelas.

Tabla 2.3

Datos de entrada de las colecciones de papa nativa del Laboratorio de genética y biotecnología vegetal - UNSCH.

N° DE ENTRADA	Nombre	DATOS DE ENTRADA					
		Nombre científico		Fecha de última modificación	Nombre del donante	N° del donante	Tipo de mantención
		Genero	Especie				
UNSCHLGBV60405SPP001-21	Carrasco	Solanum	spp.	211112	Felipe Muñoz Tineo	1	Vegetativa
UNSCHLGBV60405SPP002-21	Peruanita	Solanum	spp.	211112	Felipe Muñoz Tineo	1	Vegetativa
UNSCHLGBV60405SPP003-21	Palta mindez	Solanum	spp.	211112	Felipe Muñoz Tineo	1	Vegetativa
UNSCHLGBV60405SPP004-21	Lenguas	Solanum	spp.	211112	Felipe Muñoz Tineo	1	Vegetativa
UNSCHLGBV60405SPP005-21	Duraznillo	Solanum	spp.	211112	Felipe Muñoz Tineo	1	Vegetativa
UNSCHLGBV60405SPP006-21	Huantina	Solanum	spp.	211112	Felipe Muñoz Tineo	1	Vegetativa
UNSCHLGBV60405SPP007-21	Yuraq winchina	Solanum	spp.	211112	Felipe Muñoz Tineo	1	Vegetativa
UNSCHLGBV60405SPP008-21	Qellu runtus	Solanum	spp.	211112	Felipe Muñoz Tineo	1	Vegetativa
UNSCHLGBV60405SPP009-21	Allqa carrasco	Solanum	spp.	211112	Felipe Muñoz Tineo	1	Vegetativa
UNSCHLGBV60405SPP010-21	Ruyaq suytu	Solanum	spp.	211112	Felipe Muñoz Tineo	1	Vegetativa
UNSCHLGBV60405SPP011-21	PN4	Solanum	spp.	211112	Felipe Muñoz Tineo	1	Vegetativa
UNSCHLGBV60405SPP012-21	PN1	Solanum	spp.	211112	Felipe Muñoz Tineo	1	Vegetativa
UNSCHLGBV60405SPP013-21	Ruyru mindez	Solanum	spp.	211112	Felipe Muñoz Tineo	1	Vegetativa
UNSCHLGBV60405SPP014-21	Moro panchaela	Solanum	spp.	211112	Felipe Muñoz Tineo	1	Vegetativa
UNSCHLGBV60405SPP015-21	Puka sawinto 1	Solanum	spp.	211112	Felipe Muñoz Tineo	1	Vegetativa
UNSCHLGBV60405SPP016-21	Mariva	Solanum	spp.	211112	Felipe Muñoz Tineo	1	Vegetativa
UNSCHLGBV60405SPP017-21	Yana carrasco	Solanum	spp.	211112	Felipe Muñoz Tineo	1	Vegetativa
UNSCHLGBV60405SPP018-21	PN2	Solanum	spp.	211112	Felipe Muñoz Tineo	1	Vegetativa
UNSCHLGBV60405SPP019-21	Ruyru ritipa sisan	Solanum	spp.	211112	Felipe Muñoz Tineo	1	Vegetativa
UNSCHLGBV60405SPP020-21	Chaulina	Solanum	spp.	211112	Felipe Muñoz Tineo	1	Vegetativa
UNSCHLGBV60405SPP021-21	Huamampa uman	Solanum	spp.	211112	Feria Local	2	Vegetativa
UNSCHLGBV60405SPP022-21	Puka huayru	Solanum	spp.	211112	Feria Local	2	Vegetativa
UNSCHLGBV60405SPP023-21	Ritipa sisan	Solanum	spp.	211112	Feria Local	2	Vegetativa
UNSCHLGBV60405SPP024-21	Piñacha	Solanum	spp.	211112	Feria Local	2	Vegetativa
UNSCHLGBV60405SPP025-21	Cuchi pelo	Solanum	spp.	211112	Feria Local	2	Vegetativa
UNSCHLGBV60405SPP026-21	Wiara pasña mor.	Solanum	spp.	211112	Feria Local	2	Vegetativa
UNSCHLGBV60405SPP027-21	Puka tumillo	Solanum	spp.	211112	Silverio Dipaz Vega	3	Vegetativa
UNSCHLGBV60405SPP028-21	Sangre de cristo	Solanum	spp.	211112	Silverio Dipaz Vega	3	Vegetativa
UNSCHLGBV60405SPP029-21	Wincuello	Solanum	spp.	211112	Silverio Dipaz Vega	3	Vegetativa
UNSCHLGBV60405SPP030-21	Atuqpa papan	Solanum	spp.	211112	Silvestre	4	Vegetativa
UNSCHLGBV60405SPP031-21	Uru puñoichi	Solanum	spp.	211112	Juan Muñoz Dipaz	5	Vegetativa
UNSCHLGBV60405SPP032-21	Amarilla larga	Solanum	spp.	211112	Juan Muñoz Dipaz	5	Vegetativa
UNSCHLGBV60405SPP033-21	PN5	Solanum	spp.	211112	Juan Muñoz Dipaz	5	Vegetativa
UNSCHLGBV60405SPP034-21	Sangre de toro	Solanum	spp.	211112	Juan Muñoz Dipaz	5	Vegetativa
UNSCHLGBV60405SPP035-21	Sangre de toro	Solanum	spp.	211112	Juan Muñoz Dipaz	5	Vegetativa
UNSCHLGBV60405SPP036-21	Peruanita larga	Solanum	spp.	211112	Juan Muñoz Dipaz	5	Vegetativa
UNSCHLGBV60405SPP037-21	Camotillo	Solanum	spp.	211112	Juan Muñoz Dipaz	5	Vegetativa

UNSCHLGBV60405SPP038-21 Yuraq wirapasña	Solanum	spp.	211112	Guillermo Pillaca	6	Vegetativa
UNSCHLGBV60405SPP039-21 Yana llunchuy w.	Solanum	spp.	211112	Guillermo Pillaca	6	Vegetativa
UNSCHLGBV60405SPP040-21 Puka carrasco	Solanum	spp.	211112	Guillermo Pillaca	6	Vegetativa
UNSCHLGBV60405SPP041-21 kunkantullu	Solanum	spp.	211112	Guillermo Pillaca	6	Vegetativa
UNSCHLGBV60405SPP042-21 Lengua de vaca	Solanum	spp.	211112	Maria Tineo Pillaca	7	Vegetativa
UNSCHLGBV60405SPP043-21 PN6	Solanum	spp.	211112	Maria Tineo Pillaca	7	Vegetativa
UNSCHLGBV60405SPP044-21 Huamam uman 2	Solanum	spp.	211112	Maria Tineo Pillaca	7	Vegetativa
UNSCHLGBV60405SPP045-21 Blanca andina	Solanum	spp.	211112	Maria Tineo Pillaca	7	Vegetativa
UNSCHLGBV60405SPP046-21 Tumbay	Solanum	spp.	211112	Maria Tineo Pillaca	7	Vegetativa
UNSCHLGBV60405SPP047-21 PN9	Solanum	spp.	211112	Maria Tineo Pillaca	7	Vegetativa
UNSCHLGBV60405SPP048-21 Taragallo	Solanum	spp.	211112	Maria Tineo Pillaca	7	Vegetativa
UNSCHLGBV60405SPP049-21 Puka sawinto 2	Solanum	spp.	211112	Maria Tineo Pillaca	7	Vegetativa
UNSCHLGBV60405SPP050-21 Chanchamayina	Solanum	spp.	211112	Maria Tineo Pillaca	7	Vegetativa
UNSCHLGBV60405SPP051-21 Chiqchi wiksa	Solanum	spp.	211112	Maria Tineo Pillaca	7	Vegetativa
UNSCHLGBV60405SPP052-21 Huevo del indio	Solanum	spp.	211112	Maria Tineo Pillaca	7	Vegetativa
UNSCHLGBV60405SPP053-21 PN7	Solanum	spp.	211112	Maria Tineo Pillaca	7	Vegetativa
UNSCHLGBV60405SPP054-21 Yana wairu	Solanum	spp.	211112	Maria Tineo Pillaca	7	Vegetativa
UNSCHLGBV60405SPP055-21 PN8	Solanum	spp.	211112	Maria Tineo Pillaca	7	Vegetativa
UNSCHLGBV60405SPP056-21 Corazón de cuy	Solanum	spp.	211112	Maria Tineo Pillaca	7	Vegetativa
UNSCHLGBV60405SPP057-21 Qachirva	Solanum	spp.	211112	José Ávalos Pillaca	8	Vegetativa
UNSCHLGBV60405SPP058-21 Papa fuerte	Solanum	spp.	211112	José Ávalos Pillaca	8	Vegetativa
UNSCHLGBV60405SPP059-21 PN3	Solanum	spp.	211112	José Ávalos Pillaca	8	Vegetativa
UNSCHLGBV60405SPP060-21 Puca ñawi	Solanum	spp.	211112	José Ávalos Pillaca	8	Vegetativa
UNSCHLGBV60405SPP061-21 Qori sunqu	Solanum	spp.	211112	José Ávalos Pillaca	8	Vegetativa
UNSCHLGBV60405SPP062-21 Qellqay wiksa	Solanum	spp.	211112	Goyo Dipaz Muñoz	9	Vegetativa
UNSCHLGBV60405SPP063-21 Yungay	Solanum	spp.	211112	Goyo Dipaz Muñoz	9	Vegetativa
UNSCHLGBV60405SPP064-21 Canchan	Solanum	spp.	211112	Goyo Dipaz Muñoz	9	Vegetativa

2.5.2. Tratamientos

En la Tabla 2.4. se presenta los 64 tratamientos y el nivel de ploidia simbolizados desde T1 hasta T64.

Tabla 2.4

Lista de 64 tratamientos de papas nativas del banco de Germoplasma del Laboratorio de Genética Biotecnología vegetal de la UNSCH, Ayacucho. Tratamientos y nivel de ploidia.

Accesión		Ploidia	Accesión		Ploidia
T1	Carrasco	4x	T33	PN5	4x
T2	Peruanita	2x	T34	Sangre de toro macho	3x
T3	Palta mindez	5x	T35	Sangre de toro	4x
T4	Lenguas	4x	T36	Peruanita larga	4x
T5	Duraznillo	4x	T37	Camotillo	3x
T6	Huantina	3x	T38	Yuraq wirapasña	3x
T7	Yuraq winchina	2x	T39	Yana llunchuy waqachi	3x
T8	Quellu runtus	3x	T40	Puka carrasco	2x
T9	Allqa carrasco	4x	T41	Kunkantullu	4x
T10	Ruyaq suytu	3x	T42	Lengua de vaca	4x
T11	PN4	3x	T43	PN6	3x
T12	PN1	3x	T44	Huamapa uman 2	5x
T13	Ruyru mindez	4x	T45	Blanca andina	3x
T14	Moro panchaela	3x	T46	Tumbay	4x
T15	Puka sawinto	4x	T47	PN9	3x
T16	Mariva	4x	T48	Taragallo	2x
T17	Yana carrasco	5x	T49	Puka sawinto 2	4x
T18	PN2	4x	T50	Chanchamayina	4x
T19	Ruyru ritipa sisan	3x	T51	Chiqui wiksa	3x
T20	Chaulina	3x	T52	Huevo de indio	3x
T21	Huamapa uman	2x	T53	PN7	5x
T22	Puka huayru	3x	T54	Yana wairu	2x
T23	Ritipa sisan	3x	T55	PN8	2x
T24	Piñacha	3x	T56	Corazón de cuy	4x
T25	Cuchi pelo	4x	T57	Qachirva	4x
T26	Wiara pasña morado	5x	T58	papa fuerte	4x
T27	Puka turnillo	3x	T59	PN3	3x
T28	Sangre de cristo	2x	T60	Puca ñawi	2x
T29	Wincuello	2x	T61	Qori sunqu	2x
T30	Atuqpa papan	3x	T62	Qellqay wiksa	3x
T31	Uru puñoichi	4x	T63	Yungay	4x
T32	Amarilla larga	2x	T64	Canchan	4x

Nota: PN= papa nativa sin nombre identificado.

2.6. Diseño experimental

El diseño experimental utilizado para la evaluación de componentes de rendimiento de 64 tratamientos (papas nativas) fue látice simple 8x8 con dos repeticiones o dos bloques, cuyo modelo aditivo lineal es:

$$Y_{ijk} = \mu + T_i + B_j + S_k + ee_{ijk}$$

Donde:

Y_{ijk} : Rendimiento del i-ésimo tratamiento en la j-ésima repetición, del k-ésimo bloque incompleto.

μ : Es el promedio de las unidades experimentales

T_i : Es el efecto del i-ésimo tratamiento

B_j : Es el efecto del j-ésimo bloque o repetición

S_k : Es el k-ésimo bloque incompleto

ee_{ijk} : Es el error experimental del i-ésimo tratamiento, en la j-ésima repetición, del k-ésimo bloque incompleto.

i : varia de 1,2,3,...,t (subíndice de variación de tratamientos)

j : varia de 1,2,3,...,r (subíndice de variación de bloques o repeticiones)

k : número de bloques incompletos

Los tratamientos fueron distribuidos mediante doble randomización según el siguiente esquema de la figura 2.3:

Figura 2.3

Distribución de los 64 tratamientos de papas nativas en dos bloques con un diseño látice 8x8.

BLOQUE I								
	1	2	3	4	5	6	7	8
1	T01	T02	T03	T04	T05	T06	T07	T08
2	T09	T10	T11	T12	T13	T14	T15	T16
3	T17	T18	T19	T20	T21	T22	T23	T24
4	T25	T26	T27	T28	T29	T30	T31	T32
5	T33	T34	T35	T36	T37	T38	T39	T40
6	T41	T42	T43	T44	T45	T46	T47	T48
7	T49	T50	T51	T52	T53	T54	T55	T56
8	T57	T58	T59	T60	T61	T62	T63	T64
BLOQUE II								
	1	2	3	4	5	6	7	8
1	T01	T09	T17	T25	T33	T41	T49	T57
2	T02	T10	T18	T26	T34	T42	T50	T58
3	T03	T11	T19	T27	T35	T43	T51	T59
4	T04	T12	T20	T28	T36	T44	T52	T60
5	T05	T13	T21	T29	T37	T45	T53	T61
6	T06	T14	T22	T30	T38	T46	T54	T62
7	T07	T15	T23	T31	T39	T47	T55	T63
8	T08	T16	T24	T32	T40	T48	T56	T64

2.7. Unidades experimentales

La unidad experimental es una parcela que se muestra en la figura 2.4 cuyas dimensiones se presentan en la tabla 2.5:

Figura 2.4

Dimensiones de cada unidad experimental en el diseño látice simple 8x8.

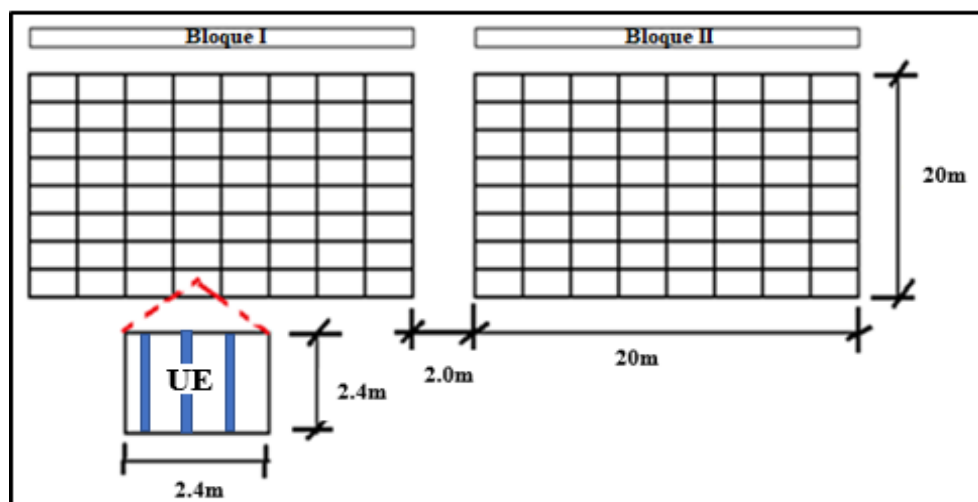


Tabla 2.5

Características dimensionales de las parcelas experimentales ubicadas en Pampa del Arco, NIPUH.

Descripción	Unidad	Medida
Ancho de UE	m	2.40
Largo de UE	m	2.40
Área de UE	m ²	5.40
Largo del bloque	m	20
Área de cada bloque	m ²	400.00
Ancho de bloque	m	20.0
Distancia entre golpes	m	0.40
Numero de surcos por parcela	unidades	3.00
Distancia entre surcos	m	0.80
Numero de tubérculos por UE	unidades	15.0
Numero de tubérculos/surco	unidades	5.0

2.8. Análisis estadístico

Para el procesamiento de datos de los caracteres cuantitativos se realizó el análisis de varianza ANOVA ($p < 0.05$), prueba de contraste de medias por Diferencia mínima significativa (DLS) y correlación de componentes principales empleando el programa

Rstudio versión 4.4.0, se usó el paquete estadístico agricolae (Statistical Procedures for agricultural Research versión 1.3-7) y paquetes del sistema base(The Rbase package 4.4.0), datasets (The R Datasets package 4.4.0), graphics (The R Graphics package 4.4.0), grDevices (The R Graphics Devices and support for colours and fonts 4.4.0), methods (Formal Methods and Classes 4.4.0), stats (The R Stats package 4.4.0) y utils (The R Utils Package 4.4.0).

2.9 Instalación y conducción del cultivo

Se condujo el campo experimental con una tecnología mixta (tradicional - extensivo).

2.9.1. Preparación del suelo

Se realizó la rotura del suelo con tractor agrícola, se hizo arado doble, posteriormente se pasó con poli rastra.

2.9.2. Estacado y demarcación del terreno

Se usó material de madera para marcar las dimensiones de cada parcela experimental, para la separación de unidades experimentales se usó rafia color rojo, y la demarcación del terreno se realizó con yeso.

2.9.3. Surcado

El surcado se realizó de manera manual usando azadones, la distancia entre surco fue de 0.80cm, según el croquis de instalación. Esta actividad se hizo un día antes de la siembra.

2.9.4. Abonamiento

Según la interpretación del análisis de suelos, el nivel de P disponible 14ppm (medio), K disponible 174.6ppm (alto), N total 0.05% (bajo) y la cantidad de M.O 0.99% (muy baja), motivo por el cual se tuvo que aplicar una fertilización de fondo, fuente orgánica (guano de alpaca a una dosis de 2kg/UE) e inorgánica (fertilizante MOLIMAX papa sierra con nivel de abonamiento 15-25-15 NPK a razón de 1Kg/UE) y de apoyo en la etapa de llenado de tubérculos, microelementos (Fetrilon-combi 4%Mn; 4%Fe, 1.5%Cu; 1.5%Zn; 0.5%B; 0.1%Mo 250g/200L y CaBZn Ca^{++} , B, Zn 1L/200L).

2.9.5. Siembra

La siembra se realizó con tubérculos brotados, la distancia entre plantas fue de 40 cm, los tubérculos semilla de papa fueron depositadas encima de la materia orgánica, los fertilizantes inorgánicos fueron esparcidos en forma de golpe entre cada semilla, la profundidad de siembra fue de aproximadamente 15 cm (3 veces el tamaño de la semilla). La siembra fue realizada de manera uniforme.

2.9.6. Riego

Como la instalación fue con tubérculos brotados, el riego fue proporcionado inmediatamente, el reporte meteorológico mencionaba que el mes de diciembre no fue necesario el riego, pero esto no se manifiesta en la realidad, ya que los datos son medias mensuales, y en la época de siembra no hubo lluvias, se instaló sistema de riego por goteo con mangueras de 2 pulgadas como eje principal, y cintas de riego, que posteriormente fueron cambiadas.

2.9.7. Deshierbo aporque y aplicación de fitorremediadores

Como parte de las labores culturales, se realizó dos aporques, el primero (qallqui) con el objetivo de oxigenar el suelo y controlar malezas, el segundo aporque (qallmar) se realizó con el fin de tuberización (tapado de estolones), luego se realizó un control preventivo contra la rancho utilizando “Mancozeb” y aplicación de insecticidas “Cipermetrina y Fastac” (por presencia de plagas ocasionales) usando coadyuvante orgánico siliconado BREAK THRU a razón de 0.15cc/L (con el objetivo de evitar lavado de los productos por la lluvia).

2.9.8. Cosecha

Las accesiones de papas nativas presentaron diferente tiempo de maduración, algunas maduraciones de cosecha temprana (precoces) otra tardía, en la maduración se observó que los tubérculos se desprendían de su piel fácilmente, motivo por el cual se dejó hasta que el tejido se suberice, en esta última etapa se evaluó el parámetro de rendimiento número de tubérculos/planta y kg/planta.

2.9.9. Almacén de Semillas

Luego de la cosecha se seleccionó 15 tubérculos por cada accesión de papa nativa para almacenar en el banco de germoplasma del Laboratorio de Genética y Biotecnología

Vegetal de la UNSCH, los tubérculos semilla fueron tratadas con producto químico TIFON (Chlorpyrifos 25g/kg + aditivos) y guardadas en oscuridad en bolsas de papel a temperatura 12-15°C.

2.9.10. Evaluación de los parámetros de componentes de rendimiento

En esta investigación se evaluaron 5 parámetros cuantitativos tomados del descriptor cuantitativo *Solanum tuberosum* desarrollado por el Centro internacional de la papa (CIP, 2008) (Misarayme, 2018), las cuales fueron:

a. Diámetro de follaje (cm)

Durante la floración se realizó la medición en forma de cruz en cada unidad experimental (UE), para obtener datos promedio de diámetro $((d1+d2)/2)$, realizada en los dos bloques.

b. Altura de la planta (cm)

Durante la plena floración se midió la altura en 5 matas por cada accesión y repetición. Se determinó la altura desde el cuello de la planta hasta la yema apical más alta del mismo tallo utilizando flexómetro.

c. Número de tallos aéreos (tallos)

Durante la floración, se contabilizó el número de tallos aéreos primarios a nivel de cuello de la planta, evaluando en total 5 matas eliminando los bordes por cada UE, en los dos bloques.

d. Número de tubérculos por mata (tub/mata)

En la cosecha se contabilizó el número total de tubérculos en 5 matas y por UE, en los dos bloques. El conteo incluyó tantos tubérculos grandes, medianas y pequeños.

e. Peso de tubérculos por planta (kg/mata)

Luego de la cosecha se pesó el número total de los tubérculos contabilizados anteriormente en las 5 matas y en toda la UE, en los dos bloques. Para determinar el rendimiento (kg/ha), relacionando el rendimiento promedio de las dos repeticiones por cada UE y se hizo el cálculo por hectárea.

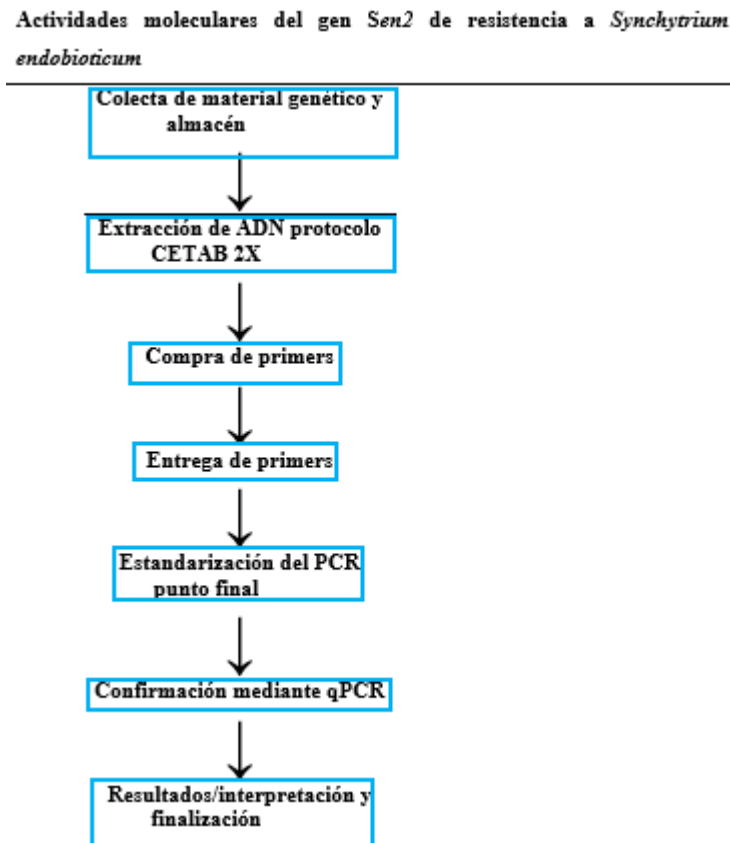
2.10. Metodología para estandarización molecular PCR

El procedimiento molecular se realizó en el Laboratorio de Genética y Biotecnología Vegetal de la Escuela Profesional de Agronomía de la UNSCH. Para la extracción de ADN se tomaron muestras de hojas tiernas que se encontraban en constante multiplicación celular “células meristemáticas” para poder realizar la estandarización de PCR punto

final, para el gen *Sen2* mediante gradiente de temperatura y se realizó la confirmación mediante PCR tiempo real (qPCR). En la Figura 2.5. se muestra el flujo del trabajo.

Figura 2.5

Flujo de trabajo de la evaluación molecular.



2.10.1. Extracción de ADN

La extracción de ADN se realizó de hojas apicales tiernas y sanas de cada accesión debidamente identificada. Se siguió el protocolo del método CTAB 2X (hexadecil bromuro de trimetil amonio) (Doyle y Doyle, 1990), modificado por CIP (1998) que se describe a continuación:

- a. Se pesó 100mg (3 hojas aprox.) de tejido de la hoja de cada accesión y luego fueron molidos en morteros esterilizados. En este trabajo no se usó nitrógeno líquido, en su reemplazo se utilizó 700uL de CTAB 2X.
- b. Luego se transfirió en un microtubo eppendorf esterilizado de 2mL de capacidad. Luego se adicionó 700 uL de buffer de extracción CTAB 2X y 2uL de β -mercaptoetanol, se agitó en Vórtex 1000rpm. Seguidamente, se incubaron en baño maría de 65°C durante 45 minutos agitando el tubo cada 15 minutos, luego de la

incubación y se retiraron los tubos para enfriarlas a temperatura de ambiente 2 minutos.

- c. Para la separación de proteínas y polisacáridos se agregó 700uL de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) y luego se agitó en vórtex hasta homogenizar el contenido.
- d. Luego se centrifugó a 12,700 rpm por 5 minutos y se transfirió el sobrenadante a un nuevo microtubo eppendorf estéril; se etiquetó el tubo. Se desechó el cloroformo: alcohol isoamílico remanente.
- e. Luego se le agregó 50uL de CTAB 10X (en NaCl 0.7M) y vórtex para homogenizar.
- f. Se repitió los pasos c y d.
- g. Para la precipitación de ácidos nucleicos se añadió volumen de 400-500uL de isopropanol frío a cada tubo y luego se mezcló por inversión para homogenizar. Posteriormente se incubó a -20°C durante 15 minutos
- h. Centrifugar a 12,700 rpm durante 20 minutos. vaciar el sobrenadante (isopropanol) cuidadosamente evitando perder el pellet de ADN, luego se dejó invertido los tubos en papel toalla por 2 minutos.
- i. Para la purificación de pellet de ADN, se añadió 1000uL de etanol al 70%, luego se centrifugó por 30 minutos a 12,700 rpm, se decantó el etanol. se agregó 1mL de etanol al 90%, luego se centrifugó a 12,700 rpm durante 30 minutos y se eliminó el etanol. Después se dejó que el precipitado se seque toda la noche en posición invertidos.
- j. Para disolver al ADN se añadió 150uL de T₁₀E₁ + 1-2 uL de ARNasa 10ng/uL (libre de ADNasa) y vórtex, finalmente se incubó a 37°C durante 1h.

Luego se conservó las muestras a -20°C.

a. Evaluación de calidad de ADN por densitometría (electroforesis)

Para esta evaluación se preparó un gel de agarosa al 1% (80mL de buffer TBE1X + 2 µL de BrEt.), se trabajó con un gel pequeño, los pocillos se llenaron con las muestras del cocktail de corrida (2 µL de NFW + 1µL de loading 6X + 3 µL de ADN) se realizó electroforesis (90V, 70A, 60´) con buffer de corrida TBE1X, finalmente se procedió a observar bandas de ADN en el transiluminador.

b. Evaluación de calidad de ADN por espectrofotometría

Para realizar el cálculo de la absorbancia se usó bioespectrofotómetro de la marca Eppendorf, usando el protocolo estandarizado del Laboratorio de Genética y Biotecnología Vegetal de la Escuela Profesional de Agronomía UNSCH.

- 1.- Se disolvió el pellet extraído de ADN con 150 μL de T10E1, y se incubó a $37^{\circ}\text{C}/1\text{h}$.
- 2.- Se realizó blanqueo con 1.0 – 1.5 μL de T10E1, realizar rotación leve (turn over) a las muestras de ADN, luego se extrajo 1.5 μL de muestra y se hizo la lectura en el espectrofotómetro (lectura en $\text{ng}/\mu\text{L}$).
- 3.- Luego de la lectura se limpió el lente objetivo con papel toalla y se repitió el paso dos (el blanqueo solo es necesario cada 10 lecturas).

2.10.2. PCR punto final

a. Cebadores

Los cebadores que se utilizaron para este trabajo de investigación se diseñaron a partir de la investigación realizada por Plich y Przetakiewicz (2015).

Tabla 2.6

Lista de primers para identificación de genes de resistencia a Synchytrium endobioticum.

Marcador	Cebador	T° A (°C)	Tamaño (pb)	Protocolo
5450_3	F: ATGATCATTGATGGCAGCAG R: GGGCATTGAGCATATAAAA	58	1046	PCR
2502_1	F: GCAGAGTTTCCACTGCTTCA R: TGATTGAAATTCAACCACTATG	60	290	PCR
2502_3	F: CCAACTCCACAACCTTTTGGCT R: CCAACTGATTGAAATTCAAC	60	1500	PCR
NL25	F: TATTGTTAATCGTTACTCCCTC R: AGAGTCGTTTACCGACTCC	58	1400	PCR

b. Dilución de cebadores

La concentración inicial de los cebadores es alta, para realizar el PCR se diluyó a una concentración de 10 μM , usando el protocolo estandarizado del Laboratorio de Genética y Biotecnología Vegetal (LGBV -UNSCH).

- 1.- Primero se hizo una dilución a 100 μM , añadiendo 10X de NFW a la concentración inicial del primer (si, F= 43.5nmol entonces 435 μL NFW; la dilución se encuentra a 100 μM), se homogenizo con vortex para mezclar, lo mismo se repite con el primer en R y para otros primers, teniendo en cuenta la concentración de cada cebador.

2.- Dilución 1/10, para ello en un tubo eppendorf separado se agregó 20uL de primer F [100uM] y se completó con 180uLNFW, obteniendo la dilución a 10uM.

3.- se conservó a -20°C hasta ser usado en el master mix.

c. Master mix

En la Tabla 2.8. se muestra los reactivos para 1Rx del trabajo realizado por Plich et al. (2018) una vez homogenizadas las concentraciones de ADN extraído, a una concentración de trabajo 20 ng/uL y diluido los primers a 10uM. Se procedió a preparar el master mix, los componentes de esta mezcla fueron integrados en el master mix cuya concentración de los insumos se determinaron mediante ensayos y pruebas.

Tabla 2.7

Master mix para gen Sen2

Reactivos	Volumen
NFW	2.74 uL
Buffer 5x	2.0 uL
MgCl ₂	2.0 uL
dNTPs	0.20 uL
F [10uM]	1.0 uL
R [10uM]	1.0uL
Taq DNA polimerasa	0.06 uL
DNA molde (20 ng/uL)	1.0 uL
V total	10.0 uL

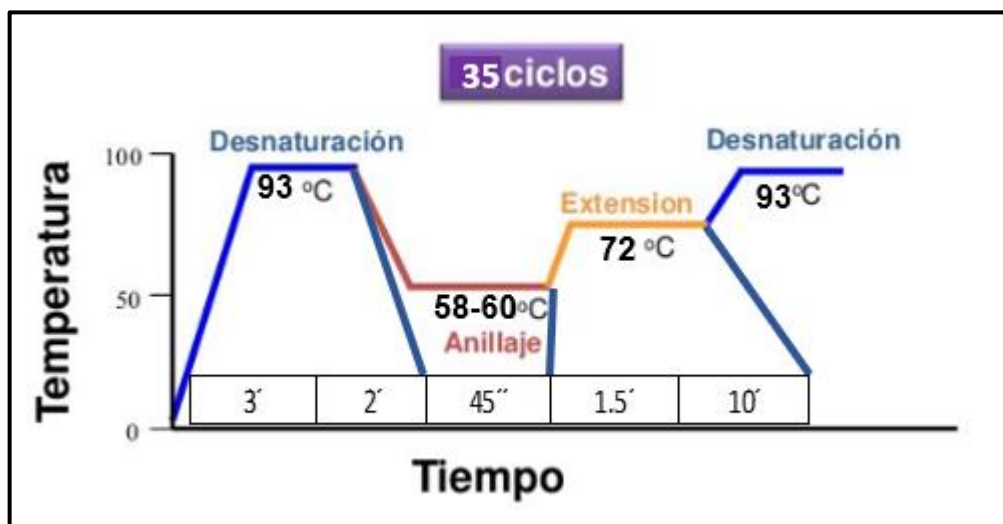
Nota: Antecedentes F y R tomados de Plich et al., 2018 y Przetakiewicz 2015

d. Perfil térmico de PCR

Se estableció el perfil térmico de PCR según los antecedentes para este trabajo de investigación, (Plich y Przetakiewicz 2015), el cual consistió de 35 ciclos: 93°C/tiempo Desnaturación; se hizo una gradiente de T° en el Anillaje de 58-60°C/45segundos; Extensión de 72°C/1.5minutos; y una Extensión final de 72°C/10 minutos programados en el termociclador eppendorf.

Figura 2.6

Perfil térmico PCR, para el gen Sen2.



e. Electroforesis de productos PCR

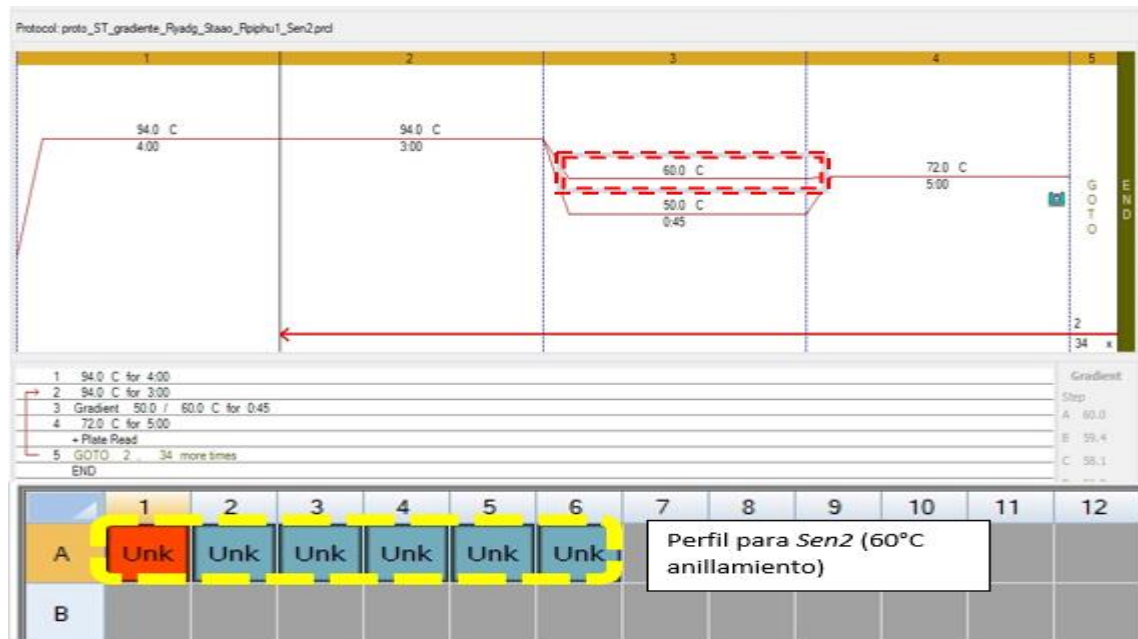
Se preparó un cocktail de corrida con (2uLNFW+3 uLprod.PCR+1uL Loading6X; para el Ladder: 1 uLLambda+4uLNFW + 1uL Loading6X) se procedió a correr mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% (1,8g de agarosa, se agregó TBE hasta volumen de 90mL, se dejó enfriar y se agregó 2.5 uL de BrEt), a 90V/70A durante 60minutos, luego estos fueron fotodocumentados para visualizar los fragmentos de ADN.

2.10.3. PCR tiempo real (qPCR)

Para ratificar las accesiones portadoras del gen *Sen2* (63, 30 y 16) del PCR punto final; fueron analizados en el termociclador tiempo real, el master mix fue preparado mezclando 1Rx 10 uL HiSYBR (Sybergreen) [1X]; 2uL primer F[10uM] y 2uL primer R[10uM] y 4uL ADN molde [A:20 ng/uL; B: 10 ng/uL]; 2uL NFW, completando el volumen total de 20uL. Luego se diseñó un perfil térmico que se muestra en la Figura 2.6. siguiendo el protocolo estandarizado de (LGBV -UNSCH) para qPCR.

Figura 2.7

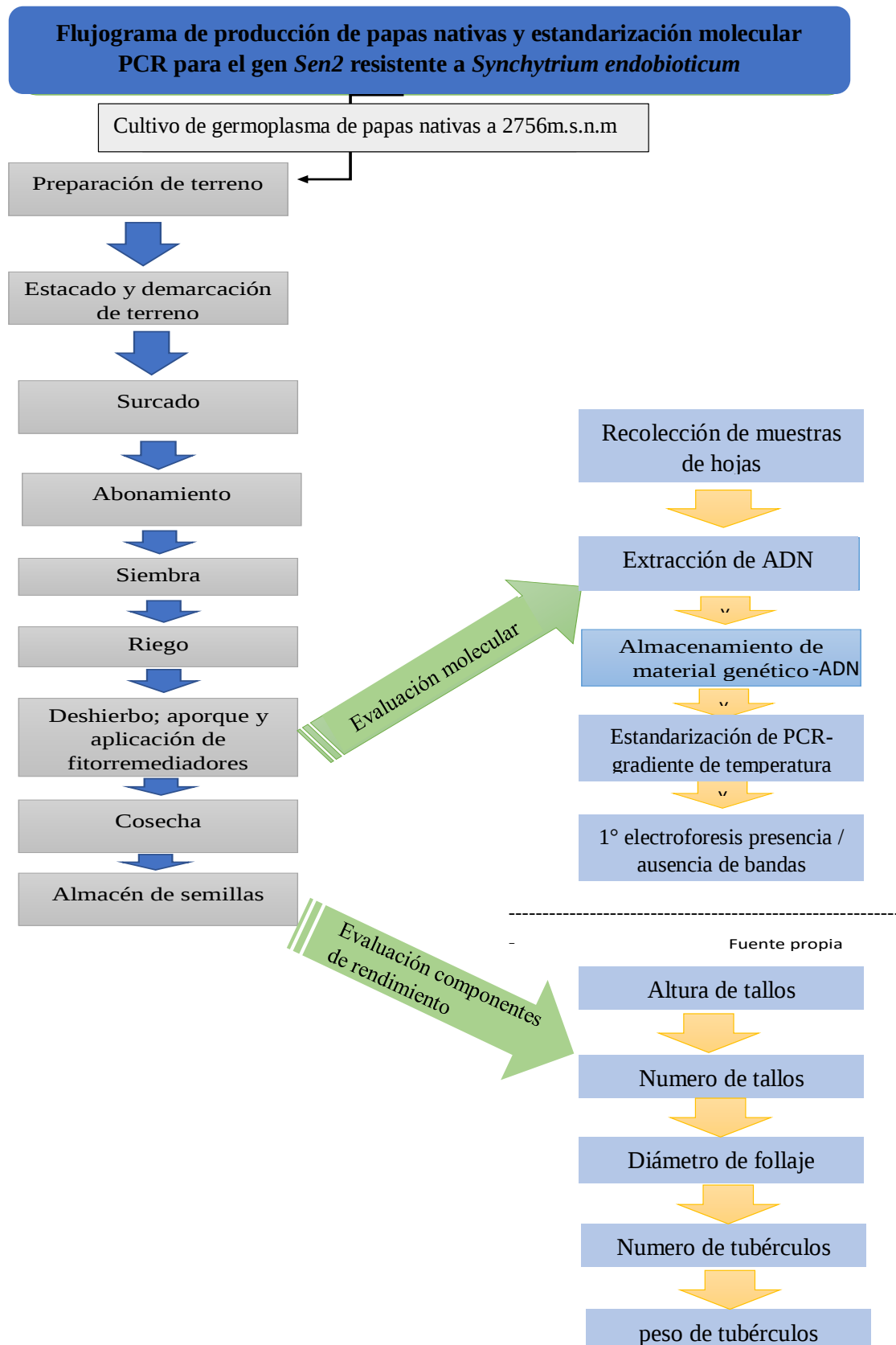
Perfil térmico qPCR y diseño de placa para gen Sen 2.



Para una mejor ilustración de todas las etapas, se muestra en la Figura 2.8 el flujo en forma resumida el proceso de evaluación y ejecución de la tesis (etapa 1, campo y 2, laboratorio) diseñado mediante flujograma.

Figura 2.8

*Flujograma de las actividades para la evaluación de análisis moleculares y componentes de rendimiento de 64 tratamientos de papa *Solanum tuberosum*.*



CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Análisis molecular

3.1.1 Extracción de ADN por espectrofotometría y densitometría

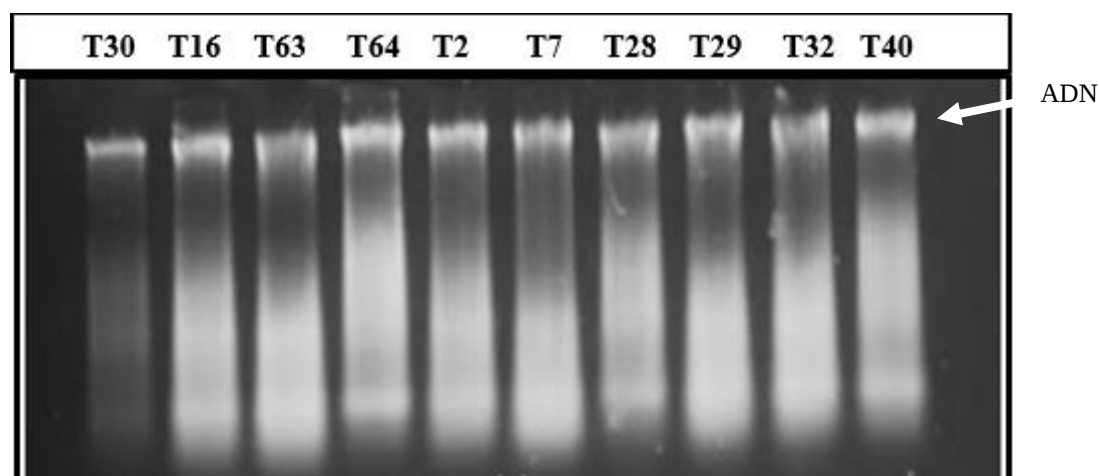
En la Figura 3.1 y Tabla 3.1 se presentan los resultados de la calidad de ADN por densitometría en gel de agarosa al 2% y electroforesis horizontal. Se muestra la cantidad de ADN de las 64 accesiones de papas realizado por espectrofotometría, reportando concentraciones en el rango de 109.4 - 1691.1 ng/uL y una absorbancia (A260/A280) de 1.89 – 2.04 los cuales indican que se encuentran en el rango óptimo categorizado como ADN de buena calidad.

Tabla 3.1*Resultados de cantidad (ng/uL) y calidad de ADN (A260/A280) por espectrofotometría.*

ACCESIONES	[ADN ng/uL	A260/A280 1.8-2.0	ACCESIONES	[ADN ng/uL	A260/A280 1.8-2.0
01	702.70	1.96	33	1017.30	1.95
02	667.40	2.04	34	720.80	1.95
03	1088.40	1.94	35	352.10	2.02
04	479.20	1.97	36	817.40	1.94
05	553.50	2.02	37	639.10	1.93
06	1052.90	1.96	38	614.90	1.94
07	907.30	1.95	39	415.00	2.00
08	958.20	1.95	40	558.90	2.03
09	690.10	1.91	41	175.50	1.94
10	609.20	1.96	42	292.70	1.96
11	229.00	1.90	43	467.10	1.95
12	599.90	1.93	44	358.20	1.97
13	532.30	1.89	45	109.40	1.90
14	930.70	2.00	46	606.20	2.00
15	1064.70	1.96	47	1078.000	1.930
16	384.50	1.96	48	481.200	1.920
17	1259.60	2.01	49	802.600	1.50
18	1220.20	1.98	50	150.30	1.93
19	1167.30	1.99	51	203.40	1.97
20	1691.10	1.98	52	701.60	1.99
21	1066.40	2.00	53	389.80	2.02
22	1014.50	2.00	54	469.90	2.03
23	714.90	2.01	55	319.40	1.92
24	345.20	1.90	56	631.80	1.97
25	600.70	1.90	57	479.10	1.94
26	426.20	1.90	58	894.40	1.98
27	517.50	1.93	59	261.20	1.96
28	872.40	1.92	60	513.00	1.93
29	787.70	1.95	61	238.10	1.94
30	944.80	1.97	62	314.50	1.93
31	485.90	1.92	63	433.00	1.93
32	547.10	1.94	64	564.90	1.99

Figura 3.1

Resultados de calidad de ADN por densitometría:



Nota: Control positivo accesiones diploides (+); muestra 1(T30), 5 (T2), 6 (T7), 7 (T28), 8 (T29), 9 (T32), 10 (T40) y control negativo (-) muestra 2 (T16), 3 (T63), 4 (T64).

3.1.2 Estandarización de PCR punto final con gradiente de temperaturas

La prueba para estandarización de PCR se realizó en 6 accesiones de papas diploides y como control positivo (portador del gen de resistencia) a la accesión 30 (Atuqpa papan) y como control negativo (susceptible, sin el gen de resistencia) a la accesión 63 (Yungay), usando como antecedente el trabajo de Plich y Przetakiewicz (2015), se diseñó un perfil térmico con gradiente de temperaturas de anillamiento desde 57°C hasta 60°C la cual se muestra en la Figura 3.2. El master mix se hizo con un volumen para 1Rx de 15 uL (2.96uL NFW; 3.0uL Buffer; 1.3 uL MgCl₂; 0.3dNTPs; 1.75uL F y R; 0.19uL Taq polimerasa y 4.0uL de ADN [20 ng/uL]) que se muestra en la tabla 3.2. la electroforesis se realizó en gel de agarosa al 2.0% corridos a 90V/70A/60'.

Tabla 3.2

Master mix para 1Rx evaluación de la presencia del gen Sen2.

Reactivos	Volumen
NFW	2.96 uL
Buffer 5x	3.0 uL
MgCl ₂	1.3 uL
dNTPs	0.30 uL
F [10uM]	1.75 uL
R [10uM]	1.75uL
Taq DNA polimerasa	0.19 uL
DNA molde (20 ng/uL)	4.0 uL
V total	15.0 uL

Figura 3.2

Diseño del perfil térmico y gradiente de temperatura para el gen Sen2.

Perfil térmico

Calentamiento: 93°C / 3'

Denaturación: 93°C / 2'

Annealing: 57°/58.5°/60° / 45''

Extensión: 72°C / 1'30''

Extensión final: 72°C / 5'

.....**35 ciclos**.....

T° de anillamiento		
<u>57°</u> <u>A</u>	<u>58.3°</u> <u>B</u>	<u>60°</u> <u>C</u>
61	7	28
32	48	60
Y	Y	Y
S	S	S
Distribución de las muestras en el termociclador		

En la Figura 3.3 se observan bandas tenues a temperatura de anillamiento de 60°C, entonces se mejoró las condiciones a esta temperatura y se volvió a realizar un PCR con un nuevo master mix, esta vez con volumen de 20uL/1Rx (Se incrementó las concentraciones ADN, Primer, taq polimerasa, dNTPs) que se detallas en la Tabla 3.3 y el nuevo diseño del perfil térmico en la Figura 3.4.

Figura 3.3

Foto-documentación de gradiente de temperatura PCR para gen Sen2.

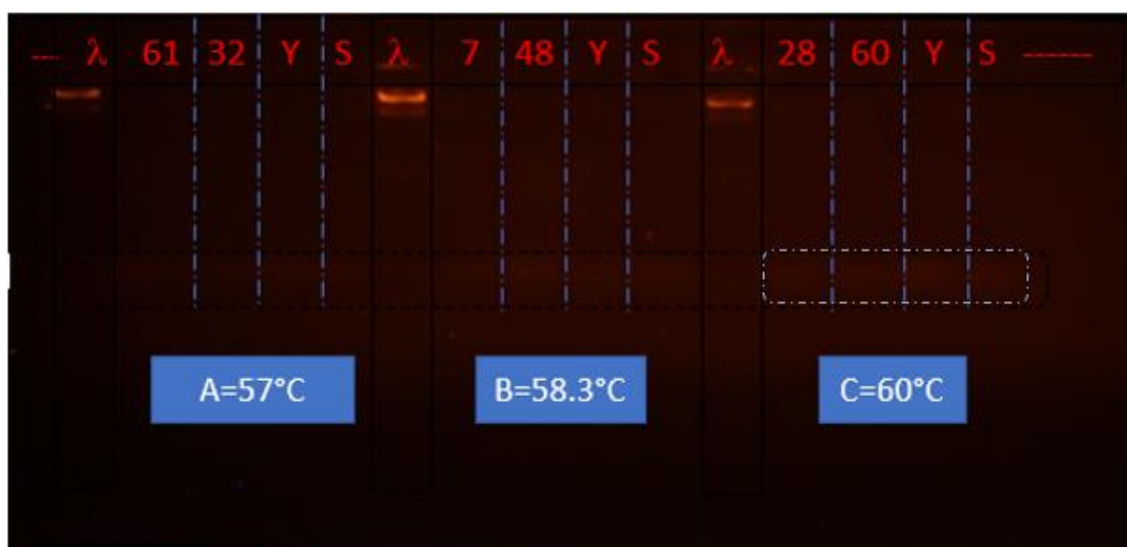
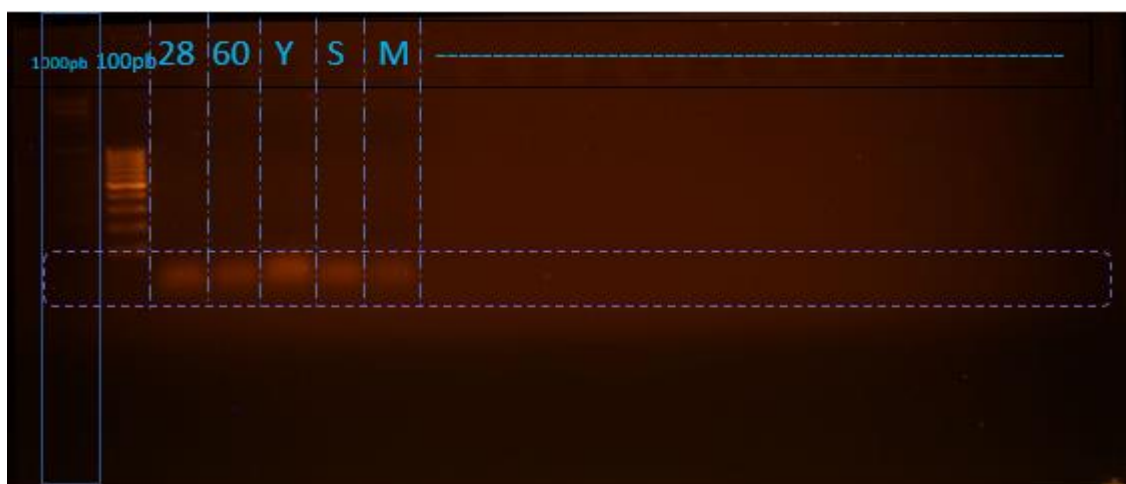


Tabla 3.3*Master mix 1Rx para segunda evaluación del gen Sen2.*

Reactivos	Volumen
NFW	3.76 uL
Buffer 5x	4.0 uL
MgCl ₂	1.6 uL
dNTPs	0.40 uL
F [10uM]	3.0 uL
R [10uM]	3.0uL
Taq DNA polimerasa	0.24 uL
DNA molde (20 ng/uL)	4.0 uL
V total	20.0 uL

Figura 3.4*Diseño del perfil térmico para el gen Sen2.*

<u>Perfil térmico</u>						
Calentamiento:	93°C / 3'					
Denaturación:	93°C / 4'					
Annealing:	60°C / 45''					
Extensión:	72°C / 1'30''					
Extensión final:	72°C / 10'					
..... <u>35 ciclos</u>						
T° de anillamiento 60°C						
1000pb	100pb	28	60	Y	S	M
Distribución de las muestras en los posos de electroforesis						

Figura 3.5*Segunda foto-documentación de producto PCR con T° de anillamiento a 60°C para gen Sen2.*

De la figura 3.5 se encontró el perfil térmico y el master mix para ubicar el gen *Sen2* resistente a *Synchytrium endobioticum* con el par de primers 5450_3 (F:5'-ATGATCATTGATGGCAGCAG-3'; R:5'-GGGCATTTTGGAGCATAAAA-3'), y se mejoró las condiciones de la primera evaluación.

3.1.3. Prueba de PCR tiempo real qPCR

Para confirmar el resultado del producto PCR punto final, se optó por realizar un PCR en tiempo real (qPCR), ya que este es más sensible al ser un PCR cuantitativo, se obtuvo los siguientes resultados que se muestran en las Figuras 3.6., 3.7. y 3.8. y la Tabla 3.4.

Tabla 3.4

Resultado de los valores Cq obtenido en 3 accesiones (T16, T30 y T63) de papa luego de PCR tiempo real (qPCR).

Well	Sample	[ng/ul]	Cq	End RFU
01	16a	20.0	26.9	820
02	16b	10.0	25.74	576
03	30a	20.0	25.33	1123
04	30b	10.0	28.07	936
05	63a	20.0	27.27	549
06	63b	0.00	0.00	76.4

Nota, a=concentración de ADN [20 ng/uL]; b= concentración de ADN [10 ng/uL]

Figura 3.6

Curva de concentración de qPCR muestra 16a y 16b.

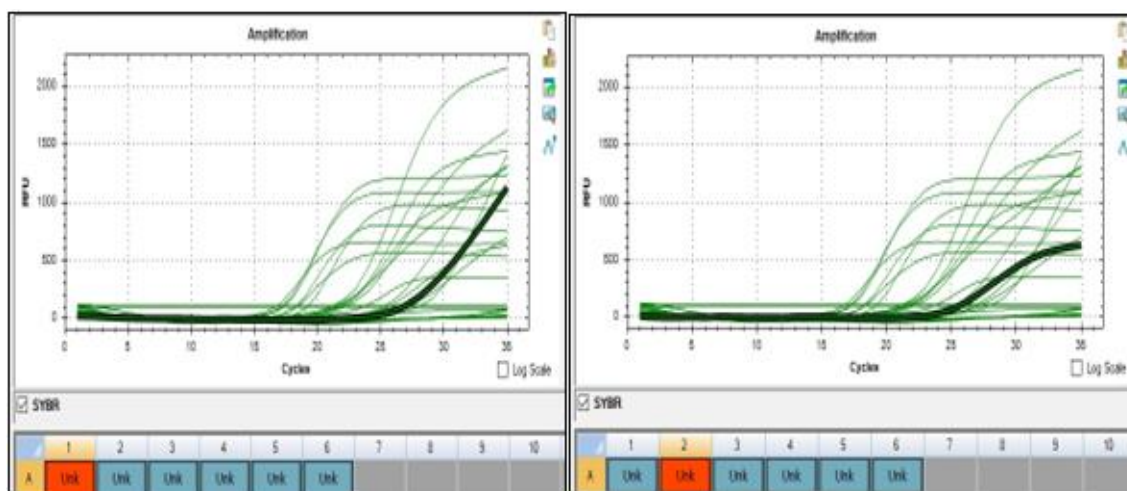


Figura 3.7

Curva de concentración de qPCR muestra 30a y 30b.

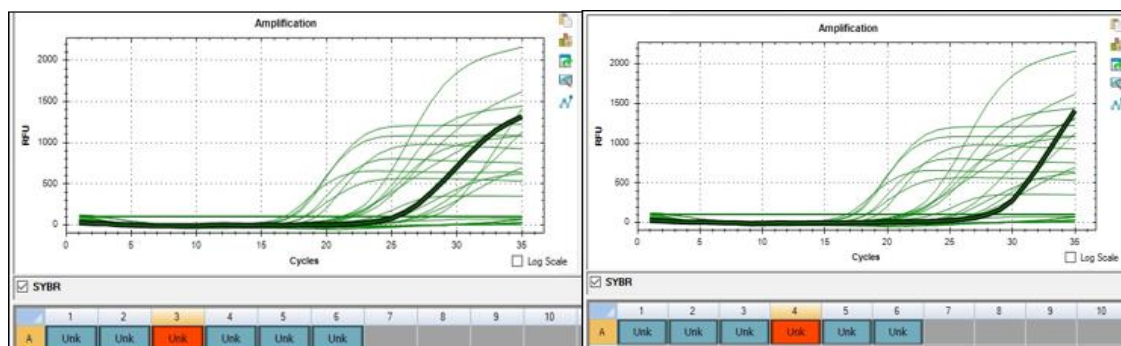
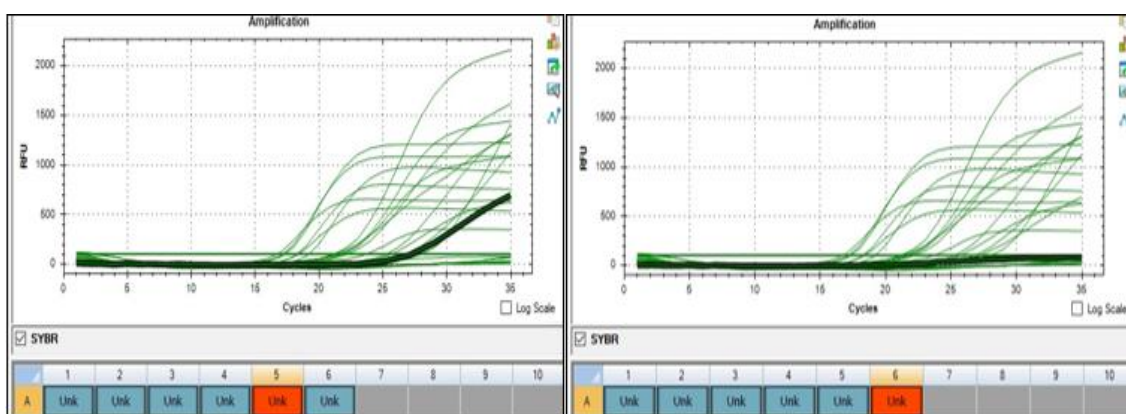


Figura 3.8

Curva de concentración de qPCR muestra 63a y 63b.



Nota: 63b control negativo (sin ADN)

En la figura 3.8 la muestra 63b no se observa curva, no hay incremento en la concentración ya que no tiene ADN y por lo tanto no existe un PCR (prueba control)

3.2 Análisis agronómico

3.2.1. Análisis de componentes de rendimiento

Usando el programa Rstudio versión R4.4.0 se realizó el análisis de varianza, se evaluó la eficiencia estadística, el coeficiente de varianza (CV) y la comparación de medias DLS, de los 64 tratamientos de papas nativas para los 5 parámetros ya descritos anteriormente.

En la Tabla 3.5. Se muestra la eficiencia del diseño látice simple frente al bloque randomizado resultando 81.81% más eficiente que el diseño DBCR, siendo este un buen indicativo estadístico; y el C.V. varía entre 8.07% a 35.96% el cual está dentro del rango permisible para este tipo de investigación. En la Tabla 3.5. Se muestra el ANOVA de las 5 variables cuantitativas de rendimiento: diámetro de follaje, altura de planta, número de

tallos, número de tubérculos por mata y kilogramos por hectárea. Se observa que entre los tratamientos por unidad ajustada existe diferencia estadística altamente significativa para los valores de diámetro de follaje (cm), altura de planta (cm) y rendimiento (Kg/ha) ($p<0.001$); en tanto que los valores del número de tallos y tubérculos por mata resultaron estadísticamente significativos ($p<0.05$).

Tabla 3.5

Resultado del análisis de varianza (ANOVA) de los 5 parámetros de rendimiento en 64 accesiones de papas nativas, significación estadística de los cuadrados medios.

FV	Df	Cuadrados medios (Mean Sq)				
		Diámetro de follaje	Altura de planta	Numero de tallos	Tubérculos por mata	Kilogramos por hectárea
Bloque	1	52.53	85.51	0.3828	416.38***	8338660
Trat. Ajus	63	1773.82***	1282.00**	9.4046*	1.7713*	166380029***
Bloques incompletos (K)	14	35.74	893.73	1.004	22.09	16166605
Complementarios		cm	cm	Unid.	Unid.	Kg/ha
Eficiencia		0.81	0.81	0.81	0.81	0.81
CV		8.07	24.46	34.62	35.96	32.31
Media		88.79	97.90	6.49	12.8	13338.2
Máximo		169.75	155.57	14.0	31.92	50592
Mínimo		17.25	13	1.0	1.69	760.5

a. Diámetro de follaje

En base al resultado de la comparación de medias mediante DLS (Tabla 3.6.) se clasificó por orden jerárquico los 64 tratamientos en 3 grupos fenotípicos de diámetro de follaje pequeño, mediano y grande, además en 9 subgrupos jerárquicos considerando la diferencia de medias ajustadas (Figura 3.9.); el fenotipo grande (subgrupos I, II, III y IV) comprende los rangos de 166.0cm (T33) hasta 101.4cm (T62); el mediano (subgrupo V) de 98.9cm (T17) hasta 80.7cm (T28); y el pequeño (subgrupos VI, VII, VIII y IX) de 18.5cm (T30) hasta 55.6cm (T4).

T30 (papa silvestre “Atuqpa papan”), resultó ser el de menor diámetro 18.5cm; la accesión T33 (PN5) resultó con el diámetro más grande 166.0cm; superando a las variedades mejoradas T63 (Yungay) con 127.5 cm, T16 (Mariva) con 120.5cm y T64 (Canchan) con 89.0cm; demostrando que existen variedades nativas con mayor potencial en cuanto al desarrollo del diámetro de follaje.

Tabla 3.6

Comparación de medias DLS ($p < 0.05$) del Diámetro de follaje en 64 tratamientos (accesiones) de papas nativas.

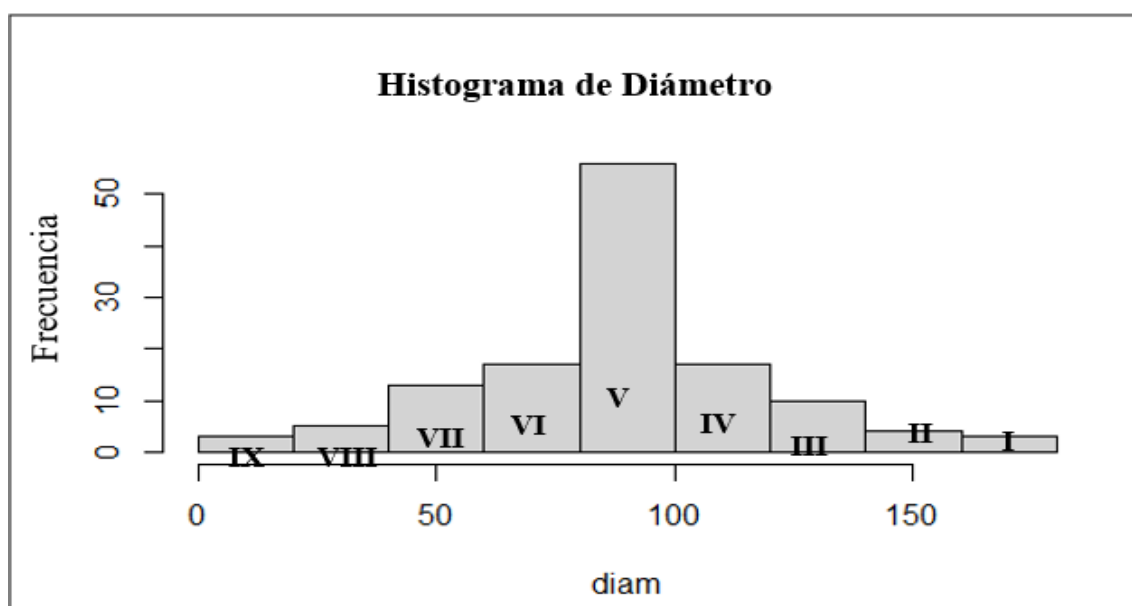
TRAT	Diam. ajustado	Grupo = Dls (0.05)	subgrupo jerárquico	Fenotipo
T33	166.02291	a	I	GRANDE
T25	161.24043	ab		
T42	148.92749	bc	II	
T55	145.12593	cd		
T50	131.03817	de	III	
T63	127.58776	ef		
T43	126.77866	ef		
T12	122.11067	efg		
T16	120.5	efg	IV	
T40	115.94275	fgh		
T35	114.24432	fghi		
T19	110.65273	ghij		
T58	104	hijk		
T61	102.94275	hijkl		
T31	102.19843	hijklm		
T57	102.12976	hijklm		
T62	101.47709	ijklm		
T17	98.93132	jklmn		
T49	97.66792	jklmno	V	MEDIANO
T7	96.16792	klmno		
T59	95.85116	klmnop		
T18	95.30157	klmnop		
T13	93.89316	klmnopq		
T34	93.39316	klmnopqr		
T6	93.05725	klmnopqr		
T41	93.05725	klmnopqr		
T56	92.08776	klmnopqr		
T24	91.85116	klmnopqr		
T27	91.46183	klmnopqr		
T32	91.16027	klmnopqr		
T38	90.37024	klmnopqr		
T48	89.47709	lmnopqr		
T45	89.37024	lmnopqrs		
T2	89.08016	mnopqrs		
T64	89.04959	mnopqrs		
T3	88.93132	mnopqrs		
T8	88.62976	mnopqrs		
T60	88.16027	mnopqrs		
T37	86.33591	nopqrs		
T20	85.46183	nopqrst		
T1	85.20992	nopqrst		
T22	84.27866	opqrst		
T39	83.98092	opqrst		
T21	82.24432	pqrstu		

T9	82.08016	pqrstu		
T28	80.77094	qrstuv		
T4	79.74043	rstuvw		
T29	75.55342	stuvwx		
T51	71.88933	tuvwx		
T36	69.55342	uvwxy	VI	
T14	69.42749	uvwxy		
T52	67.69843	vwxy		
T53	65.98092	wxyz		
T5	62.02291	xyz		
T26	55.61067	yzA		
T54	53.51525	zAB		
T47	53.01525	zAB	VII	
T10	52.95041	zAB		
T23	44.38933	ABC		
T11	40.80157	BC		
T44	36.58776	C		
T15	35.03817	C	VIII	
T46	20.40458	D		
T30	18.58776	D	IX	

PEQUEÑO

Figura 3.9

Histograma de frecuencia de medias del parámetro diámetro de follaje, se muestran los 9 subgrupos (I al IX).



Muñoz (2024) clasificó el diámetro de follaje en 3 categorías fenotípicas y 13 subgrupos jerárquicos en el rango de 35.187cm T30 “Atuq papan” hasta 77.121cm T32 “Amarilla larga” distintos a este trabajo que se reportó 3 grupos y 9 subgrupos, siendo el T30 “Atuq papan” menor diámetro de follaje (18.58cm) y T33 “PN5” mayor diámetro de follaje (166.0cm). Siendo mayor los rangos de tratamiento en esta investigación.

b. Altura de follaje

En base al resultado de la comparación de medias mediante Dls (Tabla 3.7.) se clasificó por orden jerárquico los 64 tratamientos en 3 grupos fenotípicos de Altura de follaje pequeño, mediano y grande, y en 8 subgrupos jerárquicos considerando la diferencia de medias ajustadas (Figura 3.10.); el fenotipo grande (subgrupos I y II) comprende los rangos de 120.7cm (T35) hasta 145.9cm (T55); el fenotipo mediano (subgrupo III, IV y V) comprende los rangos de 60.5cm (T36) hasta 118.7cm (T4); y el fenotipo pequeño (subgrupos VI, VII y VIII) comprende los rangos de 13.1cm (T30) hasta 56.9cm (T51) que se muestra en la Tabla 3.7.

T30 (papa silvestre “Atuqpa papan”), resultó ser el de menor altura de follajes. 13.1 cm; T55 (PN8) resultó como la mayor altura 145.9 cm; superando a las variedades mejoradas T64 (Canchan) con 117.1 cm, T63 (Yungay) con 102.8 cm y T16 (Mariva) con 22.2 cm; demostrando que existen variedades nativas con mayor potencial en cuanto al desarrollo de la altura de follaje.

Tabla 3.7

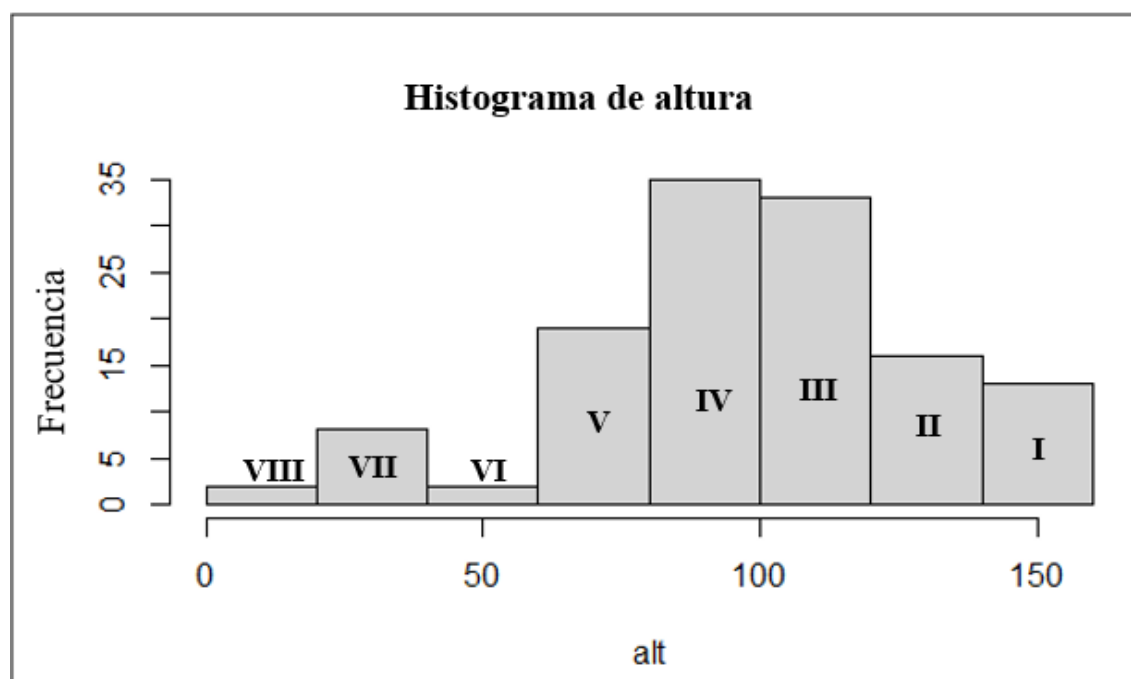
Comparación de medias DLS ($p < 0.05$) del Altura de follajes en 64 tratamientos (accesiones) de papas nativas.

TRAT	Alt. ajustado	Grupos= DLS (0.05)	subgrupo jerárquico	Fenotipo
T55	145.93893	a	I	GRANDE
T6	130.45005	ab	II	
T41	130.32005	ab		
T5	129.84942	ab		
T58	129.52543	abc		
T16	127.64043	abcd		
T13	126.29825	abcd		
T34	122.64825	abcd		
T35	120.71931	abcd		
T4	118.73942	abcd		
T25	118.20442	abcde	III	MEDIANO
T64	118.17586	abcde		
T62	114.0443	abcdef		
T40	112.92367	abcdef		
T43	112.25494	abcdef		
T39	112.17521	abcdef		
T61	111.57367	abcdef		
T22	111.51994	abcdefg		
T21	111.41931	abcdefg		
T38	109.79211	abcdefg		

T53	109.30021	abcdefg		
T26	108.19825	abcdefg		
T14	108.09388	abcdefg		
T42	106.91888	abcdefg		
T45	106.74211	abcdefg		
T48	106.0443	abcdefg		
T59	106.0265	abcdefg		
T27	105.46431	abcdefg		
T37	105.31648	abcdefg		
T8	104.84161	abcdefg		
T29	104.27148	abcdefg		
T12	103.76325	abcdefg		
T24	103.2015	abcdefg		
T63	102.82239	abcdefg		
T1	101.98736	abcdefg		
T56	100.12739	abcdefg		
T49	99.58314	abcdefg		
T20	98.49931	abcdefg		
T11	97.53607	abcdefg		
T7	96.78814	abcdefg		
T32	96.37867	abcdefgh		
T57	96.08161	abcdefgh		
T18	95.82607	abcdefgh		
T17	95.45725	abcdefgh		
T28	95.19648	abcdefgh	IV	MEDIANO
T60	95.07367	abcdefgh		
T19	94.41214	abcdefgh		
T9	92.85619	abcdefgh		
T2	92.64619	abcdefgh		
T52	91.4502	abcdefgh		
T31	91.1102	abcdefgh		
T3	88.17225	abcdefgh		
T10	73.26501	bcdefghi		
T54	70.79583	cdefghij	V	
T50	70.43697	defghij		
T36	60.59648	efghij		
T51	56.91303	fghij		
T23	56.35303	fghij	VI	
T33	52.80442	ghij		
T47	37.82083	hij		
T30	24.76711	ij	VII	
T15	22.22697	ij		
T46	20.48774	ij		
T44	13.14211	j	VIII	PEQUEÑO

Figura 3.10

Histograma de frecuencia de medias del parámetro Altura de planta, se muestran los 8 subgrupos (I al VIII).



Muñoz (2024) clasificó la altura de planta en 3 categorías fenotípicas y 14 subgrupos jerárquicos en el rango de 22.9cm T30 “Atuq papan” hasta 101.10cm T19 “Ruyru ritipa sisan” distintos a este trabajo, que reportó 3 grupos y 8 subgrupos, siendo el T44 “Huamanpa uman2” de menor altura de planta (13.14cm) y T55 “PN8” mayor altura de planta (145.9cm).

c. Número de tallos

En base al resultado de la comparación de medias mediante DLS (Tabla 3.8.) se clasificó por orden jerárquico los 64 tratamientos en 3 grupos fenotípicos de número de tallos escaso (0-4 unidades), regular (4-10 unidades) y abundante (>10 unidades), y en 7 subgrupos jerárquicos considerando la diferencia de medias ajustadas (Figura 3.11.); el fenotipo abundante (subgrupos I y II) comprende los rangos de 10.04 unidades de tallos (T45) hasta 14.12 unidades de tallos (T37); el regular (subgrupo III, IV y V) de 4.05 unidades de tallos (T36) hasta 9.99 unidades de tallos (T28); y el escaso (subgrupos VI y VII) de 0.98 unidades de tallos (T30) hasta 3.65 unidades de tallos (T54).

T30 (papa silvestre “Atuqpa papan”), resultó ser el tratamiento con escaso número de tallos, 0.98 unidades de tallos; T37 (Camotillo) resultó como el más abundante Número de tallos, 14.12 unidades, superando a las variedades mejoradas T63 (Yungay) con 7.11 unidades y T16 (Mariva) con 5.8 unidades y T64 (Canchan) con 4.88 unidades; demostrando que existen variedades nativas con mayor potencial en cuanto al desarrollo del número de tallos.

Tabla 3.8

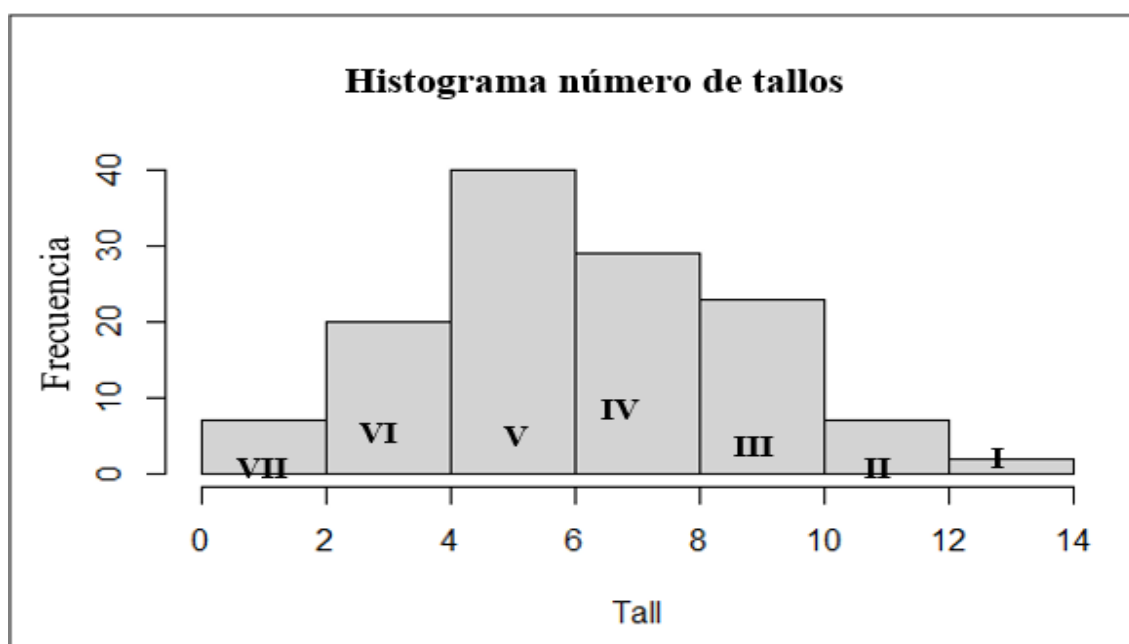
Comparación de medias DLS ($p < 0.05$) del número de tallos en 64 tratamientos (accesiones) de papas nativas.

TRAT	Tall. ajustado	Grupos= DLS (0.05)	subgrupo jerárquico	Fenotipo
T37	14.12	a	I	Abundante
T19	10.69	ab	II	
T38	10.04	abc		
T45	10.04	abc		
T28	9.99	abc		
T11	9.53	abcd	III	
T39	8.73	bcde		
T53	8.73	bcde		
T27	8.59	bcdef		
T21	8.15	bcdefg		
T18	8.03	bcdefgh		
T12	7.93	bcdefgh		
T26	7.93	bcdefgh		
T23	7.77	bcdefgh		
T48	7.42	bcdefghi		IV
T62	7.42	bcdefghi		
T5	7.38	bcdefghi		
T33	7.38	bcdefghi		
T2	7.26	bcdefghi		
T9	7.26	bcdefghi		
T31	7.17	bcdefghi		
T52	7.17	bcdefghi		
T35	7.15	bcdefghi		
T56	7.11	bcdefghi		
T63	7.11	bcdefghi		
T29	7.05	bcdefghi		
T7	6.99	bcdefghi		
T49	6.99	bcdefghi		
T32	6.93	bcdefghi		
T60	6.93	bcdefghi		
T51	6.77	bcdefghi		
T8	6.76	bcdefghi		
T57	6.76	bcdefghi		
T43	6.58	bcdefghij		
T14	6.42	bcdefghijk		

T42	6.42	bcdefghijk		
T55	6.34	bcdefghijk		
T4	6.32	bcdefghijk		
T25	6.32	bcdefghijk		
T20	6.09	cdefghijk		
T10	5.87	cdefghijk		
T6	5.80	cdefghijk		
T41	5.80	cdefghijk		
T24	5.54	cdefghijkl		
T59	5.54	cdefghijkl		
T16	5.38	defghijkl		
T58	5.38	defghijkl		
T1	5.14	defghijkl		
T50	5.11	defghijkl	V	
T40	5.00	defghijkl		
T61	5.00	defghijkl		
T3	4.92	efghijkl		
T17	4.92	efghijkl		
T64	4.88	efghijkl		
T13	4.49	efghijkl		
T34	4.49	efghijkl		
T36	4.05	fghijkl		
T54	3.65	ghijkl		
T22	3.58	hijkl		
T15	3.11	ijkl	VI	
T44	2.98	ijkl		
T47	2.15	jkl		
T46	1.96	kl	VII	
T30	0.98	l		Escaso

Figura 3.11

Histograma de frecuencia de medias del parámetro Número de tallos, se muestran los 7 subgrupos (I al VII).



Muñoz (2024) clasificó el número de tallos aéreos en 3 categorías fenotípicas y 15 subgrupos jerárquicos en el rango de 3.22 T30 “Atuq papan” hasta 11.16 T32 “Amarilla larga” distintos a este trabajo que se reportó 3 grupos y 7 subgrupos, siendo el T37 “Camotillo” mayor número de tallo (14.12) y T30 “Atuq papan” menor número de tallos (0.98), coincidiendo el T30 como el de menor media.

d. Número de tubérculos por mata

En base al resultado de la comparación de medias mediante DLS (Tabla 3.9.) se clasificó por orden jerárquico los 64 tratamientos en 4 grupos fenotípicos de número de tubérculos/mata (escaso (0-5 unidades de tubérculo/mata), regular (5-15 unidades de tubérculo/mata), abundante (15-20 unidades de tubérculo/mata) y muy abundante (>20 unidades de tubérculo/mata), y en 7 subgrupos jerárquicos considerando la diferencia de medias ajustadas (Figura 3.12.); el fenotipo muy abundante (subgrupos I y II) comprende los rangos de 20.5 unidades de tubérculo/mata (T19) hasta 27.89 unidades de tubérculo/mata (T37); el fenotipo abundante (subgrupos III) comprende los rangos de 15.15 unidades de tubérculo/mata (T9) hasta 19.8 unidades de tubérculo/mata (T38); el fenotipo regular (subgrupo IV y V) de 5.94 unidades de tubérculo/mata (T44) hasta 14.5 unidades de tubérculo/mata (T63); y el escaso (subgrupos VI y VII) de 1.96 unidades de tubérculo/mata (T30) hasta 4.07 unidades de tubérculos/mata (T47).

T30 (papa silvestre “Atuqpa papan”), resultó ser el más escaso en producción de tubérculos/mata, 1.96 unidades; T37 (Camotillo) resultó como el más abundante en tubérculos/mata, 27.89 unidades; superando a las variedades mejoradas T63 (Yungay) con 14.57 y T16 (Mariva) con 11.01 y T64 (Canchan) con 9.87; demostrando que existen variedades nativas con mayor potencial en cuanto al desarrollo de tubérculos/mata.

Tabla 3.9

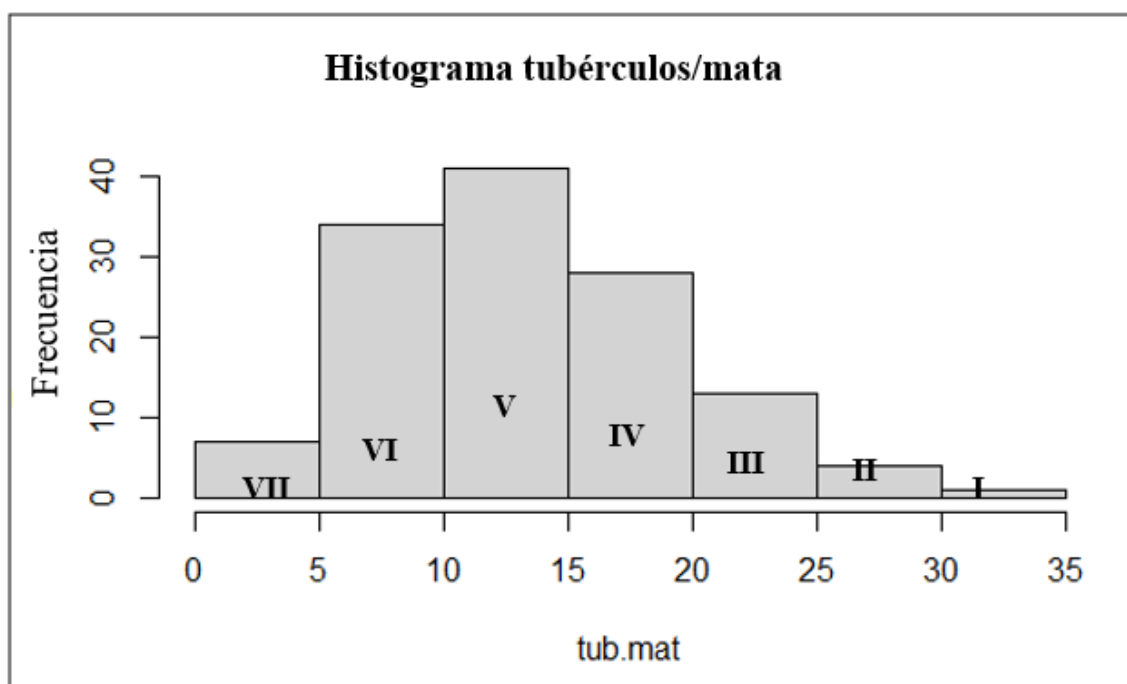
Comparación de medias DLS ($p < 0.05$) del número de tubérculos/mata en 64 tratamientos (accesiones) de papas nativas.

TRAT	Tub/mat. ajustado	Grupos= DLS (0.05)	subgrupo jerárquico	Fenotipo
T37	27.894823	a	I	Muy abundante
T19	20.542617	ab	II	
T38	19.877333	abc		
T45	19.877333	abc		
T28	19.834654	abcd		
T11	19.605271	abcd		
T27	17.988635	bcde		
T53	17.449032	bcde		
T39	16.579032	bcdef		
T62	15.886747	bcdefg	III	
T5	15.869034	bcdefg		Abundante
T23	15.822929	bcdefg		
T12	15.82129	bcdefg		
T26	15.82129	bcdefg		
T21	15.68872	bcdefg		
T18	15.605271	bcdefg		
T9	15.155586	bcdefgh		
T63	14.578446	bcdefgh		
T7	14.503243	bcdefgh		
T8	14.358449	bcdefgh		
T2	14.285586	bcdefgh		Regular
T35	13.98872	bcdefgh		
T31	13.978947	bcdefgh		
T52	13.978947	bcdefgh		
T32	13.834153	bcdefgh		
T60	13.834153	bcdefgh		
T48	13.806747	bcdefgh		
T33	13.789034	bcdefgh		
T43	13.71123	bcdefgh		
T56	13.368446	bcdefghi	IV	
T42	13.313884	bcdefghi		Regular
T49	13.293243	bcdefghij		
T57	13.148449	bcdefghij		
T29	13.044738	bcdefghij		
T4	12.90895	bcdefghij		
T25	12.61895	bcdefghij		
T14	12.393884	bcdefghij		
T55	12.103241	bcdefghij		
T41	12.101544	bcdefghij		
T51	12.042929	bcdefghij		
T10	11.807926	bcdefghij		

T20	11.658635	bcdefghij		
T6	11.471544	bcdefghij		
T24	11.118134	cdefghijk		
T16	11.010789	cdefghijk		
T59	10.778134	cdefghijk		
T58	10.670789	cdefghijk		
T1	10.523246	defghijk		
T3	10.482931	defghijk		
T40	9.954237	efghijk		
T61	9.954237	efghijk		
T64	9.873652	efghijk		
T50	9.385583	efghijk		
T17	9.272931	efghijk		
T34	9.101374	efghijk	V	
T13	8.811374	efghijk		
T36	7.994738	fghijk		
T22	7.16123	ghijk		
T54	6.621542	ghijk		
T15	6.035583	hijk		
T44	5.947248	hijk		
T47	4.071542	ijk	VI	
T46	3.949842	jk		Escaso
T30	1.967248	k	VII	

Figura 3.12

Histograma de frecuencia de medias del parámetro número de tubérculos por mata, se muestran los VII subgrupos (I al VII).



Muñoz (2024) clasificó el número de tubérculos por planta en 3 categorías fenotípicas y 12 subgrupos jerárquicos en el rango de 0.793 T30 “Atuq papan” hasta 22.99 T25 “Cuchi pelo” distintos a este trabajo que se reportó 4 categorías y 7 subgrupos, siendo el T37 “Camotillo” con mayor número de tubérculos/mata (27.89) y T30 “Atuq papan” menor número de tubérculos/mata (1.96), coincidiendo el T30 como el de menor media.

e. Peso de tubérculos (Kg/ha)

En base al resultado de la comparación de medias mediante DLS (Tabla 3.10.) se clasificó por orden jerárquico los 64 tratamientos en 5 categorías fenotípicas de peso de tubérculos (Kg/ha), resultando muy escaso (0-2000kg/ha), escaso (2000-10000kg/ha), intermedio (10000-15000kg/ha), abundante (15000-25000kg/ha) y muy abundante (>25000 kg/ha), y en 10 subgrupos jerárquicos considerando la diferencia de medias ajustadas (Figura 3.13.); el fenotipo muy abundante (subgrupos I, II y III) comprende los rangos de 26321.2 (T44) hasta 47571.5708 (T63), el fenotipo abundante (subgrupos IV y V) comprende los rangos de 15020.8 (T60) hasta 24910.98 (T41); el intermedio (subgrupo VI) de 10006.42 (T25) hasta 14643.849 (T34); y el escaso (subgrupos VII y VIII) de 2074.56 (T53) hasta 9761.44 (T24), el fenotipo muy escaso (subgrupos IX) de 600.388 (T15) hasta 1886.37 (T46).

T15 (“Puka sawinto”), resultó ser el de menor rendimiento, 0.6 kg/ha; T63 (Yungay) resultó con el rendimiento más abundante 47571.57 kg/ha; superando a las variedades mejoradas T64 (Canchan) con 31265.29 kg/ha y T16 (Mariva) con 11049.09 tn/ha.

Tabla 3.10

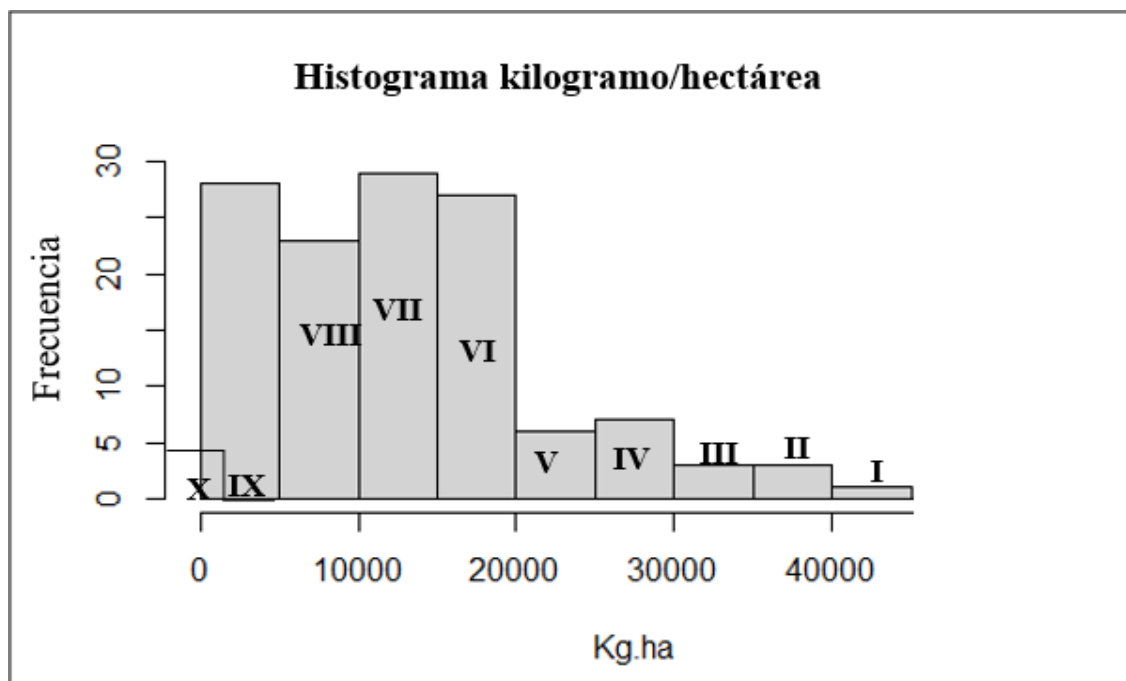
Comparación de medias DLS($p < 0.05$) del rendimiento Kg/ha en 64 tratamientos (accesiones) de papas nativas.

TRAT	Kg/ha. ajustado	Grupos= DLS (0.05)	subgrupo jerárquico	Fenotipo	
T63	47571.5708	a	I	Muy abundante	
T45	37923.547	b	II		
T64	31265.2921	bc	III		
T19	28863.8395	cd	IV		
T35	26378.2302	cde			
T44	26321.2645	cdef			
T41	24910.9825	cdefg			
T22	21610.5563	defgh			
T5	21287.1564	defghi	V		
T39	20396.2602	efghij	VI	Abundante	
T21	20373.7802	efghijk			
T42	19660.9251	efghijk			
T12	18552.7665	efghijkl			
T52	18452.9777	efghijkl			
T38	18079.547	efghijklm			
T11	17999.7583	efghijklm			
T49	17862.6957	efghijklm			
T14	17845.6751	fghijklm			
T29	17515.4384	ghijklmn			
T57	17282.567	ghijklmn			
T43	16828.6063	ghijklmn			
T4	16405.3739	ghijklmno			
T18	15746.5083	hijklmnop			
T3	15465.2157	hijklmnop			
T60	15020.849	hijklmnopq			
T34	14643.849	hijklmnopq			
T36	14236.4384	hijklmnopqr			
T20	14070.4977	hijklmnopqr			
T50	14055.3883	hijklmnopqr			
T58	13739.2596	hijklmnopqr			
T2	12852.5345	ijklmnopqrs		VII	Intermedio
T10	12600.9771	jklmnopqrs			
T51	12343.3195	jklmnopqrs			
T62	12306.2576	jklmnopqrs			
T17	11839.7157	klmnopqrst			
T16	11049.5096	lmnopqrstu			
T13	10915.099	lmnopqrstu			
T1	10693.0919	lmnopqrstuv			
T61	10565.1315	lmnopqrstuvw			
T55	10174.7994	lmnopqrstuvwx			
T59	10095.1908	lmnopqrstuvwx			
T25	10006.4239	lmnopqrstuvwx			

T24	9761.4408	mnopqrstuvwxyz		
T26	9255.1665	nopqrstuvwxyz		
T40	8953.1315	nopqrstuvwxyz		
T56	8284.7708	opqrstuvwxyz	VIII	
T37	7538.7209	pqrstuvwxyz		
T27	6481.7477	qrstuvwxyz		
T6	5944.4825	rstuvwxyz		
T32	5732.299	rstuvwxyz		
T9	4402.0345	stuvwxyz		
T28	3662.1559	tuvwxyz		
T30	3505.2645	tuvwxyz		
T31	3003.1277	uvwxyz		
T33	2946.3064	uvwxyz	IX	
T54	2936.3363	uvwxyz		
T23	2823.7195	uvwxyz		
T48	2606.6076	uvwxyz		
T8	2287.017	vxyz		
T53	2074.5602	wxyz		
T46	1886.3731	xyz		
T7	1751.1457	xyz	X	
T47	1403.5863	yz		Muy escaso
T15	600.3883	z		

Figura 3.13

Histograma de frecuencia de medias del parámetro kilogramos por hectárea (kg/ha), se muestran los X subgrupos (I al X).



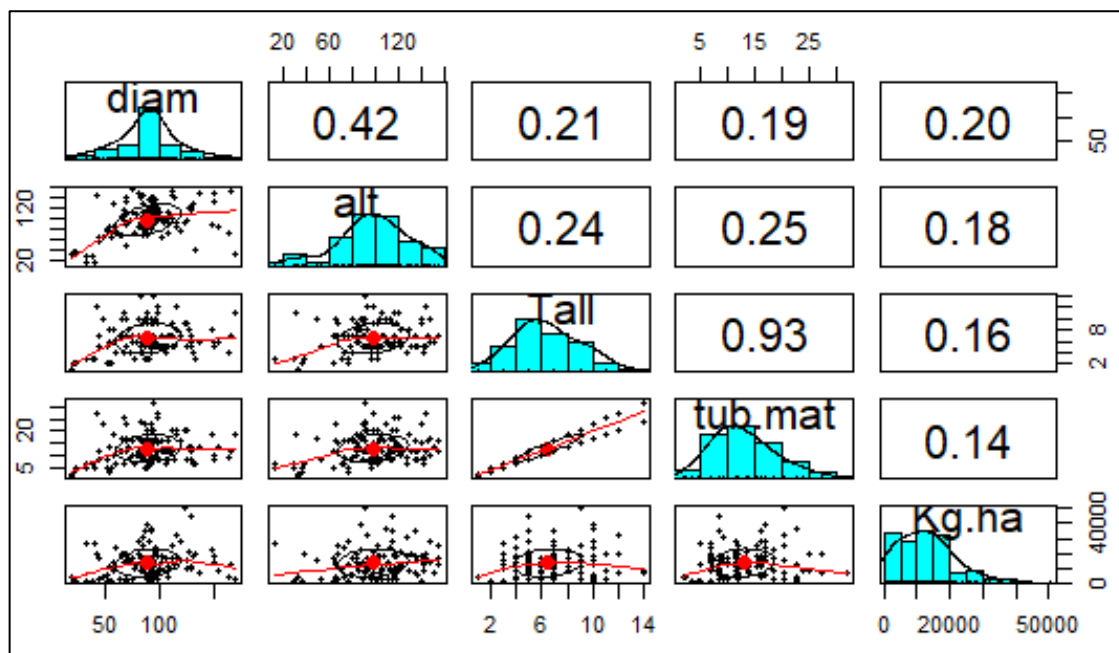
Muñoz (2024) clasificó el peso de tubérculos por planta en 3 categorías fenotípicas y 12 subgrupos jerárquicos en el rango de 0.413 kg T20 “Chaulina” hasta 1.502Kg T54 “Yana wairu” distintos a este trabajo que se reportó 5 categorías y 10 subgrupos, siendo el T63 “Yungay” con mayor rendimiento (47571 kg/ha) y T15 “Puka sawinto” (menor rendimiento (600.38kg/ha).

3.2.2. Correlación de los parámetros cuantitativos de rendimiento

La Figura 3.14 muestra la correlación que tiene cada par de parámetros, siendo los más relacionados los parámetros número de tallos y tubérculos/mata en un ($r=0.93$), lo cual indica que a mayor número de tallos incrementara de manera directa los tubérculos por mata, seguidas de la correlación del diámetro de follaje y la altura de planta ($r=0.42$), mientras que la altura de follaje y el número de tallos están correlacionados también positivamente ($r=0.24$), por último el parámetro de tubérculo/mata y kilogramos/hectárea ($r=0.14$); no se observa valores negativos de correlación, lo que indica que todos contribuyen al rendimiento.

Figura 3.14

Correlación de los 5 parámetros de rendimiento en 64 tratamientos de papas nativas.



Muñoz (2024) identificó que la mayor correlación fue entre tubérculos/mata y kilogramos/hectárea en un 72% mayor que la correlación (14%), pero la correlación de número de tallos y tubérculos/mata en este trabajo es mayor (93%) que fue reportado por

Muñoz (29.7%). Tratándose de las mismas accesiones sembradas, la diferencia se expresa en el fenotipo, ya que en este trabajo fueron sembradas a menor altitud y en otras condiciones climatológicas.

CONCLUSIONES

Bajo las condiciones de investigación en campo y laboratorio, se llega a las siguientes conclusiones:

1. El protocolo estandarizado PCR punto final para el gen *Sen2* resistente a *Synchytrium endobioticum* consta de un Master mix con volumen de 20uL 1Rx (3.76uL NFW; 4.0uL Buffer; 1.6 uL $MgCl_2$; 0.4dNTPs; 3.0uL del primer F y 3.0uL del primer R; 0.24uL Taq polimerasa y 4.0uL de ADN [20 ng/uL]); el perfil térmico consta de 35 ciclos (T° calentamiento $93^\circ C$ por 3 minutos, Denaturación $93^\circ C$ por 4 minutos, Annealing $60^\circ C$ por 45 segundos, Extensión $72^\circ C$ por minuto y medio, y extensión final de $72^\circ C$ por 10 minutos) visualizadas en gel de agarosa al 2% corridos 90V/70A/60'. Y para PCR tiempo real 1Rx de 10uL HiSYBR (Sybergreen) [1X]; 2uL primer F [10uM] y 2uL primer R [10uM] y 4uL ADN molde [A:20 ng/uL; B: 10 ng/uL]; 2uL NFW, completando el volumen total de 20uL con el mismo perfil térmico.
2. A condiciones ambientales de 2756 m.s.n.m las papas nativas presentaron: valores de diámetro de follaje de 18.58cm hasta 166.0cm (T30 "Atuq papan" y T33 "PN5" respectivamente); la altura de planta fue de 13.14cm hasta 145.9cm (T44 "Huamanpa uman2" y T55 "PN8" respectivamente); el número de tallos fue de 0.98 unidades/mata hasta 14.12 unidades/mata (T30 "Atuq papan" y T37 "Camotillo"); el número de tubérculos/mata fue de 1.96 tubérculos/mata hasta 27.89 tubérculos/mata (T30 "Atuq papan" y T37 "Camotillo" respectivamente); el rendimiento mínimo fue de 600.38 kg/ha hasta un máximo de 47571 kg/ha (T15 "Puka sawinto" y T63 "Yungay" respectivamente). Los componentes de rendimiento que más influyeron son diámetro de follaje ($r=0.2$)>altura de planta ($r=0.18$)>el número de tubérculos/mata ($r=0.16$)>peso de tubérculos kg/ha ($r=0.14$); los parámetros más correlacionados son número de tallos y tubérculos por mata ($r=0.93$), teniendo una relación directamente proporcional.

RECOMENDACIONES

- Realizar las evaluaciones de componentes de rendimiento bajo las condiciones climáticas óptimas para las papas nativas.
- Para las condiciones ambientales similares a pampa del arco 2756 m.s.n.m se recomienda sembrar las accesiones nativas T45, T19, T35, T44, T41 T22 y T5 por poseer altos rendimientos y accesiones mejoradas T63, T64 y T16, con mejor adaptación.
- Realizar la selección molecular, en las accesiones de papas nativas ayacuchanas, con el fin de identificar accesiones nativas portadoras del gen *Sen2*, resistentes a *Synchytrium endobioticum*.
- Caracterizar e identificar patotipos de *Synchytrium endobioticum* en la región de Ayacucho y fenotipar accesiones de papas nativas, en campo y en invernadero, probando distintos protocolos de inoculación, que servirán posteriormente para realizar estudios de mejoramiento genético (transcriptómica, edición genética y Genotipado por secuenciamiento GBS).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Andersen O, K. F., Forbes, G. A., Andrade-Piedra, J. L., Buddenhagen, C. E., Fulton, J. C., Gatto, M., Khidesheli, Z., Mdivani, R., Xing, Y., & Garrett, K. A. (2021). An integrated seed health strategy and phytosanitary risk assessment: Potato in the Republic of Georgia. *Agricultural Systems*, 191. <https://doi.org/10.1016/j.agsy.2021.103144>
- Brugmans, B., Hutten, B., Ronald, G., Rookmaker, O., Nico, A., Richard, G., Visser, H., & Van Eck, J. (2006). Exploitation of a marker dense linkage map of potato for positional cloning of a wart disease resistance gene. *Springer*, 112(2), 269–277. <https://doi.org/10.1007/s00122-005-0125-x>
- Cahuana Q, R., & Arcos P, J. (2002). *Variedades nativas y mejoradas de papa en Puno*. https://repositorio.inia.gob.pe/bitstream/20.500.12955/898/1/Cahuana-Variedades_nativas_Papa.pdf
- Calcaterra, N. (2005). *Los genes ciencias naturales*. <http://www.bnm.me.gov.ar/giga1/documentos/EL002318.pdf>
- Cañon, J. (2012). *El cromosoma eucariótico*. <https://www.ucm.es/data/cont/media/www/pag-56185/04-El%20cromosoma%20eucari%C3%B3tico.pdf>
- Centro Internacional De la Papa (CIP). (1998). *Protocolos de laboratorio de biología molecular Tipificación Genética*. <https://books.google.com.uy/books?id=ZmxTOpPjHZIC&printsec=frontcover#v=onepage&q&f=false>
- Centro Internacional de la Papa (CIP). (2006). *Catálogo de variedades de papa nativa Huancavelica - Perú*. <https://cipotato.org/wp-content/uploads/PDF/003524.pdf>
- Colunche N, A. (2014). *parámetros de estabilidad del rendimiento de seis genotipos de papa (Solanum tuberosum L.) en cuatro caseríos de la encañada-Cajamarca [Universidad Nacional de Cajamarca Facultad de Ciencias Agrarias]*. <https://repositorio.unc.edu.pe/bitstream/handle/20.500.14074/1816/TESIS%202014.%20ABRIL.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Diario Oficial de la Unión Europea. (2022, July 11). *medidas para erradicar y prevenir la propagación de Synchytrium endobioticum (Schilbersky) Percival*. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/PDF/?uri=CELEX:32022R1195>

- European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO). (2017a). PM 3/59 (3) *Synchytrium endobioticum*: descheduling of previously infested plots. *EPPO Bulletin*, 47(3), 366–368. <https://doi.org/10.1111/epp.12409>
- European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO). (2017b). PM 7/28 (2) *Synchytrium endobioticum*. In *EPPO Bulletin* (Vol. 47, Issue 3). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/epp.12441>
- Fierro, F. (2019). *Electroforesis de ADN*. <https://walebuble.com/wp-content/uploads/Electroforesis.pdf>
- Gabriel, J., Veramendi, S., Pinto, L., Pariente, L., & Angulo, A. (2016). Asociaciones de marcadores moleculares con la resistencia a enfermedades, caracteres morfológicos y agronómicos en familias diploides de papa (*Solanum tuberosum* L.). *Revista Colombiana de Biotecnología*, 18(1), 17–32. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v18n1.57712>
- Gob.pe, 2024. Producción de papa aumentó 16,7% a nivel nacional y cinco departamentos aportaron el 60,9% del total en marzo de 2024. Recuperada en: <https://www.gob.pe/institucion/inei/noticias/961162-produccion-de-papa-aumento-16-7-a-nivel-nacional-y-cinco-departamentos-aportaron-el-60-9-del-total-en-marzo-de-2024>
- Hehl, R., Faurie, E., Whitham, S., Baker, · B, Hesselbach, J., Salamini, · F, Gebhardt, · C, Faurie, · E, & Hesselbach, · J. (1999). Communicated by G. Wenzel TMV resistance gene N homologues are linked to *Synchytrium endobioticum* resistance in potato. *Springer LINK*, 1–8. <https://link.springer.com/article/10.1007/s001220051083>
- International Potato Center (CIP). (2022). Datos y cifras de la papa. <https://www.fao.org/4/i1127e/i1127e.pdf>
- International Potato Center (CIP). (2022). Papas para mejorar los ingresos de los productores peruanos. Recuperada en: <https://cipotato.org/es/blog-es/papas-mejorar-ingresos-productores-peruanos/>
- Kornblihtt, A. (2015). *Genoma humano*. <https://salud.gob.ar/dels/entradas/genoma-humano>
- Lutaladio, NeBambi, & Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2009). *Sustainable potato production: guidelines for developing countries*. Food and Agriculture Organization of the United Nations. <https://www.fao.org/4/i1127e/i1127e.pdf>

- Martin M, R., & Jeréz M, E. (1979). performance evaluation of potato (*Solanum tuberosum* L.) behavior as temperatures. In *Cultivos Tropicales* (Vol. 36, Issue 1). El Instituto. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0258-59362015000100012&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- Ministerio de Agricultura y Riego (MINAGRI). (2017). *catálogo de variedades de papa nativa del sureste del departamento de Junín - Perú*. <https://cipotato.org/publications/catalogo-de-variedades-de-papa-nativa-del-sureste-del-departamento-de-junin-peru/>
- Misarayme C, F. (2018). *Evaluación morfológica y rendimiento de diez accesiones de papa nativa (Solanum spp), a 4300 m.s.n.m. Vinchos – Ayacucho – 2016*. https://repositorio.unsch.edu.pe/bitstream/UNSCH/3091/1/TESIS%20AG1220_Mis.pdf
- Muñoz D, R. E. (2024). *Caracterización y selección molecular de accesiones de Papas Nativas (Solanum spp.) con genes para resistencia a Phytophthora infestans, La Mar, Ayacucho, 2022* [Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga Facultad de Ciencias Agrarias Escuela Profesional de Agronomía]. <https://repositorio.unsch.edu.pe/server/api/core/bitstreams/2a98adf4-b679-4f6b-89f1-0694d2566680/content>
- Obidiegwu, J. (2014). Manejo de la verruga de la papa: una revisión del estado actual de la investigación y perspectivas futuras. *Theor Appl Genet*, 763–780.
- Obidiegwu, J. E., Flath, K., & Gebhardt, C. (2014). Managing potato wart: A review of present research status and future perspective. *Springer*, 127(4), 763–780. <https://doi.org/10.1007/s00122-014-2268-0>
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), 2024. Día Internacional de la Papa. Recuperada en: <https://www.fao.org/international-potato-day/es>
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO). (2008). *producción mundial de papa*. <https://www.fao.org/3/i0500s/i0500s03a.pdf>
- Plich, J., Przetakiewicz, J., Śliwka, J., Flis, B., Wasilewicz-Flis, I., & Zimnoch-Guzowska, E. (2018). Novel gene *Sen2* conferring broad-spectrum resistance to *Synchytrium endobioticum* mapped to potato chromosome XI. *Theoretical and Applied Genetics*, 131(11), 2321–2331. <https://doi.org/10.1007/s00122-018-3154-y>

- Przetakiewicz, J. (2015). The Viability of Winter Sporangia of *Synchytrium endobioticum* (Schilb.) Perc. from Poland. *American Journal of Potato Research*, 92(6), 704–708. <https://doi.org/10.1007/s12230-015-9480-6>
- Remón G, Y. K., & Peña R, G. (2018). Diversidad genética de papas nativas (*Solanum* spp.) del distrito de Vilcashuamán, Ayacucho- Perú, mediante AFLP. *Revista Peruana de Biología*, 25(3), 259–266. <https://doi.org/10.15381/rpb.v25i3.15209>
- Rogozina, E. V., Terentjeva, E. V., Potokina, E. K., Yurkina, E. N., Nikulin, A. V., & Alekseev, Y. I. (2019). Multiplex PCR-based identification of potato genotypes as donors in breeding for resistance to diseases and pests. *Sel'skokhozyaistvennaya Biologiya*, 54(1), 19–30. <https://doi.org/10.15389/agrobiology.2019.1.19eng>
- Sánchez, M. A. (2017). *Determination of ploidy in native potato accessions (Solanum tuberosum group Andigenum) from the Plant Germplasm Bank of CORPOICA*. 22(2), 6–13.
- Tamay de Dios, L., Ibarra, C., & Velasquillo, C. (2013). *Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real*. 2, 70–78. www.medigraphic.org.mxhttp://www.medigraphic.com/ridwww.medigraphic.org.mx
- Tirado M., R., Tirado L., R., Mendoza C., J., Tirado M., R., Tirado L., R., & Mendoza C., J. (2018). interacción genotipo x ambiente en rendimiento de papa (*Solanum tuberosum* L.) con pulpa pigmentada en Cutervo, Perú. *Chilean Journal of Agricultural & Animal Sciences*, 34(ahead), 0–0. <https://doi.org/10.4067/S0719-38902018005000502>
- Torres, H. (2002). *Manual de las enfermedades más importantes de la papa en el Perú*. Centro Internacional de la Papa.
- Valladolid, A., Blas, R., & Gonzáles, R. (2014). *RAICES ANDINAS Contribuciones al conocimiento y a la capacitación*. https://cipotato.org/wp-content/uploads/2014/06/06_Introduc_recuento_cromo_somat.pdf
- van de Vossenbergh, B. T. L. H., Prodhomme, C., Vossen, J. H., & van der Lee, T. A. J. (2022b). *Synchytrium endobioticum*, the potato wart disease pathogen. *Molecular Plant Pathology*, 23(4), 461–474. <https://doi.org/10.1111/mpp.13183>
- van de Vossenbergh, B. T. L. H., van Gent, M., Meffert, J. P., Nguyen, H. D. T., Smith, D., van Kempen, T., Helderma, C. M., Rosendahl-Peters, K. C. H. M., Braak, N. te, Flath, K., Przetakiewicz, J., Perez, W., Çakir, E., Sikharulidze, Z. V., van Leeuwen, G. C. M., & van der Lee, T. A. J. (2024). Molecular characterization and

- comparisons of potato wart (*Synchytrium endobioticum*) in historic collections to recent findings in Canada and the Netherlands. *Journal of Plant Pathology*, 106(2), 363–375. <https://doi.org/10.1007/s42161-022-01299-5>
- van de Vossenberg, B. T. L. H., Warris, S., Nguyen, H. D. T., van Gent-Pelzer, M. P. E., Joly, D. L., van de Geest, H. C., Bonants, P. J. M., Smith, D. S., Lévesque, C. A., & van der Lee, T. A. J. (2019). Comparative genomics of chytrid fungi reveal insights into the obligate biotrophic and pathogenic lifestyle of *Synchytrium endobioticum*. *Scientific Reports*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-45128-9>
- Xu, X., Pan, S., Cheng, S., Zhang, B., Mu, D., Ni, P., Zhang, G., Yang, S., Li, R., Wang, J., Orjeda, G., Guzman, F., Torres, M., Lozano, R., Ponce, O., Martinez, D., De La Cruz, G., Chakrabarti, S. K., Patil, V. U., ... Visser, R. G. F. (2011). Genome sequence and analysis of the tuber crop potato. *Nature*, 475(7355), 189–195. <https://doi.org/10.1038/nature10158>
- Yan, L., Li, Y., Qing, Y., Tao, X., Wang, H., Lai, X., & Zhang, Y. (2022). Integrative Analysis of Genes Involved in the Global Response to Potato Wart Formation. *Frontiers in Plant Science*, 13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.865716>

ANEXOS

Anexo 0.1 Datos cuantitativos de rendimiento de los 64 tratamientos de papas nativas, del germoplasma del laboratorio de Genética y Biotecnología Vegetal.

TRAT	ACCESIONES	Diámetro de follaje (cm)			Altura de la planta (cm)			Nº de tallos (unidad)			Tubérculos/planta (unidad)			Rendimiento (kg/ha)		
		Y1			Y2			Y3			Y4			Y5		
		I	II	PROM	I	II	PROM	I	II	PROM	I	II	PROM	I	II	PROM
T1	Carrasco	92.5	77.5	85.0	123.0	108.8	115.9	5.0	6.0	5.5	11.4	10.1	10.8	10416.0	11847.0	11131.5
T2	Peruanta	84.8	94.3	89.5	110.8	98.5	104.7	6.0	9.0	7.5	13.7	15.2	14.4	13392.0	13000.5	13196.3
T3	Paiza mindez	94.0	86.0	90.0	116.4	77.3	96.8	7.0	3.0	5.0	16.0	5.1	10.5	18600.0	12618.0	15609.0
T4	Lenguas	74.3	82.8	78.5	155.6	84.8	120.2	7.0	6.0	6.5	16.0	10.1	13.1	16120.0	16965.0	16542.5
T5	Duraznillo	66.3	58.8	62.5	186.1	73.3	129.7	11.0	4.0	7.5	25.1	6.8	15.9	19096.0	23880.0	21488.0
T6	Huantina	96.5	89.5	93.0	136.8	135.8	136.3	5.0	7.0	6.0	11.4	11.8	11.6	4960.0	6969.0	5964.5
T7	Yuraq winchina	94.3	96.8	95.5	114.1	96.8	105.4	9.0	5.0	7.0	20.5	8.5	14.5	1984.0	2027.9	2006.0
T8	Qellu runtus	87.0	89.0	88.0	118.2	102.0	110.1	9.0	5.0	7.0	20.5	8.5	14.5	2976.0	2027.9	2502.0
T9	Allpa carrasco	91.3	73.8	82.5	98.0	111.8	104.9	9.0	6.0	7.5	20.5	10.1	15.3	7192.0	2299.5	4745.8
T10	Ruyaq suyu	52.0	56.0	54.0	83.3	83.5	83.4	6.0	6.0	6.0	13.7	10.1	11.9	11408.0	14292.0	12850.0
T11	PN4	41.3	43.8	42.5	144.7	64.0	104.3	12.0	7.0	9.5	27.4	11.8	19.6	19344.0	16753.7	18048.9
T12	PN1	115.8	127.3	121.5	84.4	122.3	103.3	8.0	8.0	8.0	18.2	13.5	15.9	16864.0	20326.4	18595.2
T13	Ruyru mindez	82.5	107.5	95.0	142.0	106.5	124.3	4.0	5.0	4.5	9.1	8.5	8.8	14136.0	7906.5	11021.3
T14	Moro panchaela	69.0	71.0	70.0	131.6	92.5	112.1	5.0	8.0	6.5	11.4	13.5	12.5	19344.0	16198.0	17771.0
T15	Puka sawinto 1	37.5	32.5	35.0	0.0	29.0	14.5	0.0	3.0	1.5	0.0	5.1	2.5	0.0	760.5	380.3
T16	Mariva	128.3	112.8	120.5	120.8	141.3	131.0	6.0	5.0	5.5	13.7	8.5	11.1	10168.0	12171.5	11169.8
T17	Yana carrasco	90.0	110.0	100.0	103.0	105.3	104.1	3.0	7.0	5.0	6.8	11.8	9.3	14632.0	9335.0	11983.5
T18	PN2	101.0	93.0	97.0	65.0	140.3	102.6	7.0	9.0	8.0	16.0	15.2	15.6	14136.0	17455.2	15795.6
T19	Ruyru rtiipa sisan	111.5	114.5	113.0	102.2	93.5	97.9	9.0	12.0	10.5	20.5	20.3	20.4	25296.0	32130.0	28713.0
T20	Chaulina	81.8	89.3	85.5	100.4	89.0	94.7	5.0	7.0	6.0	11.4	11.8	11.6	13888.0	13938.0	13913.0
T21	Huamampa umari	84.0	84.0	84.0	145.3	66.8	106.0	7.0	9.0	8.0	16.0	15.2	15.6	15624.0	24936.0	20280.0
T22	Puka huayru	83.8	87.3	85.5	127.5	96.8	112.1	4.0	3.0	3.5	9.1	5.1	7.1	30504.0	12167.9	21336.0
T23	Rtiipa sisan	47.5	42.5	45.0	65.8	53.8	59.8	10.0	5.0	7.5	22.8	8.5	15.6	3224.0	2343.8	2783.9
T24	Piñacha	91.3	93.8	92.5	117.0	89.5	103.3	6.0	5.0	5.5	13.7	8.5	11.1	7192.0	12171.5	9681.8
T25	Cuchi pelo	155.0	165.0	160.0	85.0	154.3	119.6	6.0	7.0	6.5	13.7	11.8	12.8	8680.0	11607.1	10143.5
T26	Wiaza pasia mor	57.5	52.5	55.0	129.8	85.8	107.8	8.0	8.0	8.0	18.2	13.5	15.9	8432.0	10163.2	9297.6
T27	Puka tumillo	97.3	85.8	91.5	99.3	104.0	101.7	12.0	5.0	8.5	27.4	8.5	17.9	5952.0	6696.5	6324.2
T28	Sangre de cristo	69.3	87.8	78.5	88.8	79.5	84.2	10.0	10.0	10.0	22.8	16.9	19.9	2232.0	4764.0	3498.0
T29	Wincuello	84.5	65.5	75.0	79.5	103.8	91.6	4.0	10.0	7.0	9.1	16.9	13.0	16616.0	18214.0	17415.0
T30	Atucpa papan	17.8	17.3	17.5	0.0	3.3	1.6	0.0	1.0	0.5	0.0	6.0	3.0	0.0	130.0	65.0
T31	Uru puñochi	108.3	92.8	100.5	73.6	101.0	87.3	7.0	7.0	7.0	16.0	11.8	13.9	3968.0	1945.3	2956.7
T32	Amarilla larga	91.8	87.3	89.5	80.9	97.5	89.2	7.0	7.0	7.0	16.0	11.8	13.9	5456.0	5835.9	5646.0
T33	PN5	163.3	169.8	166.5	73.3	32.0	52.6	4.0	11.0	7.5	9.1	18.6	13.9	4216.0	2078.3	3147.1
T34	Sangre de toro m	96.3	92.8	94.5	99.2	142.0	120.6	5.0	4.0	4.5	11.4	6.8	9.1	21328.0	8172.0	14750.0
T35	Sangre de toro	120.0	112.0	116.0	76.1	154.5	115.3	7.0	7.0	7.0	16.0	11.8	13.9	27280.0	25288.5	26284.5
T36	Peruanta larga	71.5	66.5	69.0	95.9	0.0	48.0	4.0	0.0	2.0	9.1	0.0	4.6	14136.0	0.0	7068.0
T37	Camotillo	93.8	81.3	87.5	91.1	91.0	91.1	14.0	14.0	14.0	31.9	23.7	27.8	7192.0	77812.0	42502.0
T38	Yuraq wirapasaña	86.5	95.5	91.0	90.6	112.5	101.6	10.0	10.0	10.0	22.8	16.9	19.9	11904.0	23820.0	17862.0
T39	Yana llunchuy wa	87.0	81.0	84.0	66.0	147.5	106.8	7.0	10.0	8.5	16.0	16.9	16.4	12896.0	27931.0	20413.5
T40	Puka carrasco	106.5	125.5	116.0	113.0	95.3	104.1	5.0	5.0	5.0	11.4	8.5	9.9	7936.0	9925.0	8930.5
T41	kunkantullu	91.5	94.5	93.0	135.3	137.0	136.1	7.0	5.0	6.0	16.0	8.5	12.2	35216.0	14646.0	24931.0
T42	Lengua de vaca	148.3	150.8	149.5	86.8	135.0	110.9	8.0	5.0	6.5	18.2	8.5	13.3	21824.0	17348.5	19586.3
T43	PN6	125.0	131.0	128.0	98.2	127.5	112.9	9.0	4.0	6.5	20.5	6.8	13.6	15376.0	17732.0	16554.0
T44	Huamam umari 2	31.3	39.8	35.5	13.0	0.0	0.0	3.0	0.0	1.5	6.8	0.0	3.4	26040.0	0.0	13020.0
T45	Blanca andina	92.0	88.0	90.0	110.0	87.0	98.5	10.0	10.0	10.0	22.8	16.9	19.9	35712.0	39700.0	37706.0
T46	Tumbay	21.3	19.8	20.5	36.5	0.0	18.3	2.0	0.0	1.0	4.6	0.0	2.3	1488.0	0.0	744.0
T47	PN9	51.3	53.8	52.5	76.8	0.0	38.4	2.0	0.0	1.0	4.6	0.0	2.3	1240.0	0.0	620.0
T48	Taragallo	91.0	87.0	89.0	101.5	105.0	103.3	4.0	11.0	7.5	9.1	18.6	13.9	2728.0	2078.3	2403.1
T49	Puka sawinto 2	101.0	93.0	97.0	98.2	118.3	108.2	5.0	9.0	7.0	11.4	15.2	13.3	17608.0	18627.0	18117.5
T50	Chanchamayina	133.0	129.0	131.0	38.7	115.8	0.0	3.0	7.0	5.0	6.8	11.8	9.3	19096.0	9335.0	14215.5
T51	Chiqchi wiksa	77.3	67.8	72.5	71.7	49.0	60.3	3.0	10.0	6.5	6.8	16.9	11.9	9176.0	15431.0	12303.5
T52	Huevo del indio	68.0	64.0	66.0	107.0	68.3	87.6	7.0	7.0	7.0	16.0	11.8	13.9	17360.0	19453.0	18406.5
T53	PN7	69.0	63.0	66.0	139.5	68.3	103.9	10.0	7.0	8.5	22.8	11.8	17.3	1240.0	2943.6	2091.8
T54	Yana wairu	54.5	51.5	53.0	64.5	78.3	71.4	2.0	5.0	3.5	4.6	8.5	6.5	992.0	4553.5	2772.8
T55	PN8	137.0	151.0	144.0	150.7	148.0	149.3	6.0	6.0	6.0	13.7	10.1	11.9	6200.0	14292.0	10246.0
T56	Corazón de cuy	98.5	83.5	91.0	116.8	83.5	100.2	5.0	9.0	7.0	11.4	15.2	13.3	5456.0	11176.2	8316.1
T57	Qachirva	105.8	97.3	101.5	100.2	102.5	101.4	5.0	9.0	7.0	11.4	15.2	13.3	16368.0	18627.0	17497.5
T58	Papa fuerte	112.0	96.0	104.0	144.6	121.3	132.9	5.0	6.0	5.5	11.4	10.1	10.8	15872.0	11847.0	13859.5
T59	PN3	102.8	90.3	96.5	90.4	121.8	106.1	5.0	6.0	5.5	11.4	10.1	10.8	8184.0	11847.0	10015.5
T60	Puca ñawi	93.3	79.8	86.5	92.0	83.8	87.9	7.0	7.0	7.0	16.0	11.8	13.9	10416.0	19453.0	14934.5
T61	Qori sunqu	106.5	99.5	103.0	92.8	112.8	102.8	5.0	5.0	5.0	11.4	8.5	9.9	11160.0	9925.0	10542.5
T62	Qellqay wiksa	97.0	105.0	101.0	121.0	101.5	111.3	11.0	4.0	7.5	25.1	6.8	15.9	7489.6	16716.0	12102.8
T63	Yungay	123.3	129.8	126.5	90.4	115.3	102.8	9.0	5.0	7.0	20.5	8.5	14.5	50592.0	44613.8	47602.9
T64	Canchan	90.0	86.0	88.0	115.4	114.3	114.8	5.0	5.0	5.0	11.4	8.5	9.9	27776.0	34737.5	31256.8
	Máximo	163.25	169.75	166.5	186.0909091	154.5	149.33333	14	14	14	31.92	23.66	27.79	50592	77812	47602.9
	Mínimo	17.8	17.3	17.5	13.0	3.3	1.6	2.0	1.0	0.5	4.6	5.1	2.3	992.0	130.0	65.0
	Promedio	89.4	88.2	88.8	98.8	93.1	94.7	6.4	6.4	6.4	14.5	10.8	12.7	13020.8	13968.5	13494.7
	Desv. Estandar	29.33	31.01	29.78	34.93	38.31	32.77	2.89	2.93	2.39	6.59	4.86	4.69	9799.35	12662.82	9799.97

Anexo 0.2 Análisis de varianza ANOVA de los 5 parámetros cuantitativos en 64 accesiones de papas nativas con el diseño látice simple 8x8, usando Software Rstudio.

Response: diámetro					
	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
rep	1	53	52.53	1.0210	0.3172
trat.unadj	63	111751	1773.82	34.4760	<2e-16 ***
bloq/rep	14	500	35.74	0.6947	0.7684
Residual	49	2521	51.45		
Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1					
Response: altura de planta					
	Df	SumSq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
rep	1	86	85.51	0.1487	0.70147
trat.unadj	63	80766	1282.00	2.2290	0.00207 **
bloq/rep	14	12512	893.73	1.5540	0.12744
Residual	49	28182	575.14		
Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1					
Response: número de tallos					
	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
rep	1	0.38	0.3828	0.0757	0.78430
trat.unadj	63	592.49	9.4046	1.8609	0.01261 *
bloq/rep	14	77.48	5.5346	1.0952	0.38528
Residual	49	247.63	5.0537		
Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1					
Response: tubérculos/mata					
	Df	SumSq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
rep	1	416.38	416.38	19.4238	5.7e-05 ***
trat.unadj	63	2392.19	37.97	1.7713	0.01953 *
bloq/rep	14	309.28	22.09	1.0305	0.44056
Residual	49	1050.39	21.44		
Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1					
Response: kilogramos por hectárea					
	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
rep	1	8.3387e+06	8338660	0.4489	0.5060
trat.unadj	63	1.0482e+10	166380029	8.9573	3.181e-13 ***
bloq/rep	14	2.2633e+08	16166605	0.8704	0.5937
Residual	49	9.1016e+08	18574769		
Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1					

Anexo 0.3 Catálogo fotográfico de desarrollo de investigación etapa 1 Núcleo de Investigación de la Universidad de Huamanga (NIPUH).



A: preparación de terreno, B: recolección de guano de alpaca, C: apertura de surcos y abonamiento, D: distribución de tratamientos, E: emergencia, F: desarrollo, G: 1er aporque, H: 2do aporque.



I: aplicación de fitorremediadores, J: evaluación de ultimo estado fenológico, K: diámetro de follaje, L: altura de planta, M: número de tallos, N: tubérculos/mata, O: kilogramos/mata.

Anexo 0.4 Catálogo fotográfico de desarrollo de investigación etapa 2 Laboratorio de Genética y Biotecnología Vegetal (LGBV) – UNSCH.



A: extracción ADN, método CETAB2X, B: pellet de ADN, C: cámara de electroforesis, D: gel de agarosa en cámara UV, E: diseño de perfil térmico PCR, F: cálculo de parámetro de rendimientos, G: análisis de componentes de rendimiento usando Software R 4.4.0.

ESTANDARIZACIÓN DE PCR “GEN *Sen2*” DE RESISTENCIA A *Synchytrium endobioticum* Y COMPONENTES DE RENDIMIENTO EN PAPAS NATIVAS, PAMPA DEL ARCO, AYACUCHO 2756 M.S.N.M.

Luis Enrique Vargas Cordova; Germán Fernando De La Cruz Lapa

Área de investigación: Biotecnología

Línea de investigación: Mejoramiento Genético Agropecuario

luis.vargas.01@unsch.edu.pe

german.delacruz@unsch.edu.pe

RESUMEN

Sen2 es el gen de resistencia de amplio espectro frente al *Synchytrium endobioticum*, agente causal de la verruga de la papa. Siendo este hongo fitopatógeno un problema mundial para los productores de papa, los objetivos fueron: realizar el protocolo estandarizado de PCR para el gen *Sen2* y evaluar los componentes de rendimiento en 64 accesiones de papas nativas cultivadas a 2756 m.s.n.m. se usó el diseño experimental látice simple 8x8 con dos bloques. El análisis de datos cuantitativos se realizó mediante ANOVA ($p < 0.05$), correlación de los componentes del rendimiento con el programa Rstudio. El protocolo estandarizado de PCR punto final para el gen *Sen2* resultó: extracción de ADN por método CETAB 2X; el PCR (1Rx) contiene 3.76 µl NFW; 4.0 µl de Buffer; 1.6 µl $MgCl_2$; 0.4 µl dNTPs; 3.0 µl F y R; 0.24 µl Taq polimerasa; 4.0 µl ADN [20ng/µl]; el perfil térmico Calentamiento: 93°C / 3'; Denaturación: 93°C / 4'; Annealing: 60°C / 45''; Extensión: 72°C / 1'30''; Extensión final: 72°C / 10' con 35 ciclos, observadas en gel de agarosa 1.8% de agarosa, teñido con 2.5 µl de BrEt, corridos en electroforesis (90V, 78A, 60'), y con el mismo perfil térmico para PCR tiempo real (qPCR) 1Rx de 10uL HiSYBR (Sybergreen) [1X]; 2uL primer F [10uM] y 2uL primer R [10uM] y 4uL ADN molde [A:20 ng/uL; B: 10 ng/uL]; 2uL NFW, completando el volumen total de 20uL. El rendimiento mínimo fue de 600.38 kg/ha hasta un máximo de 47571 kg/ha (T15 “Puka sawinto” y T63 “Yungay” respectivamente). Los componentes que influyeron en el rendimiento (por orden jerárquico) son diámetro de follaje ($r=0.2$)>altura de planta ($r=0.18$)>el número de tubérculos/mata ($r=0.16$)>peso de tubérculos kg/ha ($r=0.14$); los parámetros más correlacionados son número de tallos y tubérculos por mata ($r=0.93$).

Palabras clave: *Synchytrium endobioticum*, protocolo PCR, gen *Sen2*, componentes de rendimiento, papas nativas.

**“Sen2 GENE” PCR STANDARDIZATION FOR RESISTANCE TO *Synchytrium endobioticum* AND YIELD COMPONENTS IN NATIVE POTATOES,
PAMPA DEL ARCO, AYACUCHO 2756 M.A.S.L.**

ABSTRACT

Sen2 is the broad-spectrum resistance gene against *Synchytrium endobioticum*, the causal agent of potato wart. Since this phytopathogenic fungus is a global problem for potato producers, the objectives were: to standardize the PCR protocol for the *Sen2* gene and to evaluate yield components in 64 accessions of native potatoes cultivated at 2756 m above sea level. A simple lattice experimental design 8x8 with two blocks was used. Quantitative data analysis was performed using ANOVA ($p < 0.05$) and correlation of yield components with RStudio software. The standardized endpoint PCR protocol for the *Sen2* gene resulted in: DNA extraction by the CETAB 2X method; the PCR (1Rx) contains 3.76 μ L NFW; 4.0 μ L Buffer; 1.6 μ L $MgCl_2$; 0.4 μ L dNTPs; 3.0 μ L F and R; 0.24 μ L Taq polymerase; 4.0 μ L DNA [20 ng/ μ L]; the thermal profile was Heating: 93°C / 3'; Denaturation: 93°C / 4'; Annealing: 60°C / 45"; Extension: 72°C / 1'30"; Final extension: 72°C / 10' with 35 cycles, observed on a 1.8% agarose gel, stained with 2.5 μ L of BrEt, run in electrophoresis (90V, 78A, 60") and with the same thermal profile for real-time PCR (qPCR) 1Rx of 10 μ L HiSYBR (Sybergreen) [1X]; 2 μ L primer F [10 μ M] and 2 μ L primer R [10 μ M] and 4 μ L template DNA [A: 20 ng/ μ L; B: 10 ng/ μ L]; 2 μ L NFW, completing a total volume of 20 μ L. The minimum yield was 600.38 kg/ha up to a maximum of 47571 kg/ha (T15 “Puka sawinto” and T63 “Yungay” respectively). The components that influenced yield (in hierarchical order) are foliage diameter ($r=0.2$) > plant height ($r=0.18$) > number of tubers per plant ($r=0.16$) > tuber weight kg/ha ($r=0.14$); the most correlated parameters are the number of stems and tubers per plant ($r=0.93$).
Keywords: *Synchytrium endobioticum*, PCR protocol, *Sen2* gene, yield components, native potatoes.

1. INTRODUCCIÓN

El Chytridiomyceto *Synchytrium endobioticum* (Schilbersky) Percival, es el agente causal de la enfermedad denominada verruga de la papa (potato wart) (Obidiegwu et al., 2014), esta enfermedad es de la más devastadora a nivel mundial, generando altas pérdidas económicas (van de Vossen et al., 2022). La diseminación de la enfermedad se dio a través de la propagación asexual con semillas infectadas, llevadas de países andinos hacia

el resto del mundo, adaptándose perfectamente y desarrollando nuevos patotipos. En la actualidad este patógeno es considerado la plaga cuarentenaria más importante del mundo, siendo clasificado en la categoría A2 por European and Mediterranean Plant Protection Organization, (EPPO) (2017) y la unión europea (UE) (Diario Oficial de la Unión Europea, 2022).

En 1896 Schilberszky reportó por primera vez la “verruca de la papa” en Hungría y en el Perú el encargado en reportar el patógeno fue Abbott en 1928, en aquel entonces con una incidencia de hasta un 20% (Torres, 2002). Hodgson 1974 citado por Obidiegwu et al. (2014) menciona que el control químico no es efectivo, las medidas tomadas fue el de desarrollar variedades resistentes. Hasta 1941 se conocía un solo patotipo de *S. endobioticum* (patotipo común, patotipo 1 o 1D1), la mayoría de variedades eran resistentes a este patotipo, desde esa fecha hasta el 2006 se identificó 30 patotipos nuevos (Obidiegwu et al., 2014), se consideran el 1(D1), 2(G1), 6(O1), 8(F1) y 18(T1) como los más importantes y ampliamente distribuida en Europa (Plich et al., 2018). No se reportan patotipos identificados en el Perú. La resistencia al patotipo común 1D1 ya no es efectiva actualmente en Europa y demás países donde se cultiva papa, además de ello la falta de rotación de cultivo favorece la propagación de los esporangios del hongo (Obidiegwu et al., 2014).

Actualmente *S. endobioticum* es considerado el patógeno cuarentenario más importante de la papa, motivando su inclusión en la lista de cuarentena A2 EPPO, (2017) provocando altas pérdidas de rendimiento (estimaciones del 60% al 90%) y contaminación del suelo a largo plazo por más de 40 años (Plich et al., 2018 y Przetakiewicz, 2015).

El gen *Sen2* fue mapeado en el cromosoma XI de la papa, reporta resistencia contra 8 patotipos de *Synchytrium endobioticum* en Polonia, los patotipos recolectados fueron de los países mediterráneos y mayores productores de papa en Europa (Alemania, Polonia, Ucrania, Países bajos) (Plich et al., 2018).

La papa es el tercer cultivo más importante del mundo, cultivada en 159 países consumida por más de 1000 millones de personas en todo el mundo, contribuye a la seguridad alimentaria y al empleo de la población rural y urbana (FAO, 2024). Es el sustento de 700 000 agricultores peruanos, la mayoría pequeños agricultores (International Potato Center (CIP), 2022). Perú tuvo un incremento de producción de papa en un 16.7%; Ayacucho incrementó en 61.2%, a nivel nacional se registró 607 901 toneladas reportada en el último censo realizada por el INEI-ENAGRO (Gob.pe, 2024). Ayacucho es una región considerada productora de papa, principalmente de las variedades Canchan, Yungay,

Mariva, Peruanita, Amarilla Tumbay y Wayro, representando el 80% de producción total de papa en la región ayacuchana; los agricultores de esta región y otras regiones del país reportaron (<https://latinanoticias.pe/regiones/esta-es-la-peor-enfermedad-que-puede-atacar-a-la-papa-en-el-peru>) que la verruga de la papa causada por *Synchytrium endobioticum* les genera pérdidas económicas importantes. No se tiene cuantificado el efecto negativo de *Synchytrium endobioticum* en el rendimiento de este cultivo.

Un suelo infestado con *Synchytrium endobioticum* deja de ser útil para variedades comerciales susceptibles (Yungay), perjudicando así a los agricultores de papa y poniendo en riesgo la seguridad alimentaria; por lo cual es importante hacer investigaciones buscando seleccionar accesiones de papas nativas portadoras del gen de resistencia *Sen2*; debido a que el tratamiento químico no es eficiente, es contaminante del medio ambiente, deja residuos tóxicos en el suelo y deteriora la calidad del suelo (Plich et al., 2018 y Przetakiewicz, 2015).

Por lo cual el problema identificado es: ¿Cuál es el protocolo estandarizado de PCR para el gen *Sen2* que da resistencia a *Synchytrium endobioticum* y cuáles son los componentes de rendimiento en accesiones de papas nativas cultivadas en Ayacucho a 2756 m.s.n.m? El presente trabajo pretende contribuir en la solución de dicho problema, debido que en la región de Ayacucho no existe investigaciones que reporten variedades resistentes a *Synchytrium endobioticum*, ya que este hongo es reportado como el patógeno cuarentenario más importante del mundo donde se cultiva la papa (Plich et al., 2018). Considerando los antecedentes del uso de variedades resistentes para el manejo y control de esta enfermedad, herramientas biotecnológicas y selección molecular, se podría ayudar a identificar accesiones de papas nativas portadoras de los genes de resistencia a *Synchytrium endobioticum* (*Sen2*) (Gabriel et al., 2016). En un futuro próximo, con estos conocimientos, se podría desarrollar un nuevo programa de mejoramiento genético molecular y biotecnológico para el cultivo de la papa; también se podría crear una nueva variedad de papa, con resistencia a *Synchytrium endobioticum* y que tenga altos rendimientos. Los resultados del presente trabajo de investigación también servirán para crear políticas de bioseguridad gubernamental frente a este patógeno.

Por lo ante dicho, el objetivo general fue elaborar protocolos para el análisis molecular orientados a identificar la presencia de genes de resistencia a *Synchytrium endobioticum* en el germoplasma de papa de la región de Ayacucho y determinar los valores relacionados a los componentes de rendimiento en accesiones de papas nativas cultivadas a 2756 m.s.n.m

Objetivos específicos:

- 1. Estandarizar el protocolo molecular (PCR) para el gen *Sen2* que da resistencia a la papa contra el *Synchytrium endobioticum* en condiciones del Laboratorio de Genética y Biotecnología Vegetal (LGBV) - UNSCH.
- 2. Determinar los valores de componentes de rendimiento (cuantitativos) en 64 accesiones de papas nativas cultivadas a 2756 m.s.n.m.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Está investigación se realizó en la provincia de Huamanga, departamento Ayacucho, se instaló a una altitud de 2756 m.s.n.m, con coordenadas UTM 13°09′19″S, 74°13′08W″, clima seco, precipitación media anual de 493.5 mm, tempera promedio anual 16°C. La investigación se realizó durante los meses de diciembre 2023 hasta abril (campo) y junio (laboratorio) 2024. Se trabajo con 64 accesiones de papas (60 nativas, 1 silvestre 3 mejoradas), procedentes del germoplasma del Laboratorio de Genética y Biotecnología Vegetal (LGBV – UNSCH) (Tabla 1).

Tabla 1

Lista de 64 tratamientos de papas nativas del banco de Germoplasma del Laboratorio de Genética Biotecnología vegetal de la UNSCH, Ayacucho. Tratamientos y nivel de ploidia.

Accesión			Ploidia		
Accesión			Ploidia		
T1	Carrasco	4x	T33	PN5	4x
T2	Peruanita	2x	T34	Sangre de toro macho	3x
T3	Palta mindez	5x	T35	Sangre de toro	4x
T4	Lenguas	4x	T36	Peruanita larga	4x
T5	Duraznillo	4x	T37	Camotillo	3x
T6	Huantina	3x	T38	Yuraq wirapasña	3x
T7	Yuraq winchina	2x	T39	Yana llunchuy w.	3x
T8	Quellu runtus	3x	T40	Puka carrasco	2x
T9	Allqa carrasco	4x	T41	Kunkantullu	4x
T10	Ruyaq suytu	3x	T42	Lengua de vaca	4x
T11	PN4	3x	T43	PN6	3x
T12	PN1	3x	T44	Huamanpa uman 2	5x
T13	Ruyru mindez	4x	T45	Blanca andina	3x
T14	Moro panchaela	3x	T46	Tumbay	4x
T15	Puka sawinto	4x	T47	PN9	3x
T16	Mariva	4x	T48	Taragallo	2x
T17	Yana carrasco	5x	T49	Puka sawinto 2	4x
T18	PN2	4x	T50	Chanchamayina	4x
T19	Ruyru ritipa sisan	3x	T51	Chiqui wiksa	3x
T20	Chaulina	3x	T52	Huevo de indio	3x
T21	Huamampa uman	2x	T53	PN7	5x

T22	Puka huayru	3x	T54	Yana wairu	2x
T23	Ritipa sisan	3x	T55	PN8	2x
T24	Piñacha	3x	T56	Corazón de cuy	4x
T25	Cuchi pelo	4x	T57	Qachirva	4x
T26	Wiara pasña mor	5x	T58	papa fuerte	4x
T27	Puka turnillo	3x	T59	PN3	3x
T28	Sangre de cristo	2x	T60	Puca ñawi	2x
T29	Wincuello	2x	T61	Qori sunqu	2x
T30	Atuqpa papan	3x	T62	Qellqay wiksa	3x
T31	Uru puñoichi	4x	T63	Yungay	4x
T32	Amarilla larga	2x	T64	Canchan	4x

Nota: ploidia realizada en una investigación anterior, PN= papa nativa sin nombre identificado.

2.1. Diseño experimental

Se utilizó el diseño experimental Látice simple 8x8 distribuidos con doble randomización en dos bloques o repeticiones. Modelo Aditivo Lineal (MAL): $Y_{ijk} = \mu + T_i + B_j + S_k + e_{ijk}$ (Talamantes, 1986). La unidad experimental (2.4m x 2.4m) estuvo conformada por 3 surcos, distanciados 0.8m y 5 tubérculos por surco. Para el procesamiento de datos de los caracteres cuantitativos se realizó el análisis de varianza ANOVA ($p < 0.05$), prueba de contraste de medias por Diferencia mínima significativa (DLS) y correlación de componentes principales empleando el programa Rstudio versión 4.4.0, se usó el paquete estadístico agricolae (Statistical Procedures for agricultural Research versión 1.3-7) y paquetes del sistema base (The Rbase package 4.4.0), datasets (The R Datasets package 4.4.0), graphics (The R Graphics package 4.4.0), grDevices (The R Graphics Devices and support for colours and fonts 4.4.0), methods (Formal Methods and Classes 4.4.0), stats (The R Stats package 4.4.0) y utils (The R Utils Package 4.4.0).

2.2. Análisis fisicoquímico del suelo

Se instaló en un suelo con pH 8.32 (moderadamente alcalino), conductividad eléctrica 0.66 dS/m (ligeramente salino), CIC efectiva 22.8 Cmol/kg, materia orgánica 0.99% (bajo), nitrógeno total 0.05% (bajo), potasio disponible 174.6ppm (alto), fósforo disponible 14.4ppm (medio), con una clase textural franco arenoso, a falta de nutrientes se realizó un abono de fondo fuente orgánica (guano de alpaca a una dosis de 2kg/UE) e inorgánica (fertilizante MOLIMAX papa sierra con nivel de abonamiento 15-25-15 NPK a razón de 1Kg/UE) y de apoyo en la etapa de llenado de tubérculos, microelementos (Fetrilon-combi 4%Mn; 4%Fe, 1.5%Cu; 1.5%Zn; 0.5%B; 0.1%Mo 250g/200L y CaBZn Ca^{++} , B, Zn 1L/200L).

2.3. Manejo agronómico

Se realizó la rotura del suelo con tractor agrícola, se hizo arado doble, posteriormente se pasó con poli rastra, se hizo demarcación del terreno con rafias y yeso, el surcado se realizó a 0.80m, el abonamiento fue orgánico y sintético, se sembró un tubérculo por golpe (40cm), se usó cintas de riego, se realizó primer aporque (qallqui), y segundo aporque (qallmar), se hizo un control preventivo contra la ranchara utilizando “Mancozeb” y aplicación de insecticidas “Cipermetrina y Fastac” (por presencia de plagas ocasionales) usando coadyuvante orgánico siliconado BREAK THRU a razón de 0.15cc/L (con el objetivo de evitar lavado de los productos por la lluvia), Las accesiones de papas nativas presentaron diferente tiempo de maduración, algunas maduraciones de cosecha temprana (precoces) otra tardía, en la maduración se observó que los tubérculos se desprendían de su piel fácilmente, motivo por el cual se dejó hasta que el tejido se suberice, Luego de la cosecha se seleccionó 15 tubérculos por cada accesión de papa nativa para almacenar en el banco de germoplasma del Laboratorio de Genética y Biotecnología Vegetal de la UNSCH, los tubérculos semilla fueron tratadas con producto químico TIFON (Chlorpyrifos 25g/Kg + aditivos) y guardadas en oscuridad en bolsas de papel a temperatura 12-15°C.

2.4. Componentes de rendimiento

En esta investigación se evaluaron 5 parámetros cuantitativos tomados del descriptor cuantitativo *Solanum tuberosum* desarrollado por el Centro internacional de la papa (CIP, 2008) (Misarayme, 2018), las cuales fueron: diámetro de follaje (cm), altura de la planta (cm), número de tallos aéreos (tallos), número de tubérculos por mata (tub/mata), Peso de tubérculos por planta (kg/mata).

Durante la floración se realizó la medición en forma de cruz en cada unidad experimental (UE), para obtener datos promedio de diámetro $((d1+d2)/2)$, realizada en los dos bloques. durante la plena floración se midió la altura en 5 matas por cada accesión y repetición. Se determinó la altura desde el cuello de la planta hasta la yema apical más alta del mismo tallo utilizando flexómetro. Durante la floración, se contabilizó el número de tallos aéreos primarios a nivel de cuello de la planta, evaluando en total 5 matas eliminando los bordes por cada UE, en los dos bloques. En la cosecha se contabilizó el número total de tubérculos en 5 matas y por UE, en los dos bloques. El conteo incluyó tantos tubérculos grandes, medianas y pequeños. Luego de la cosecha se pesó el número total de los tubérculos contabilizados anteriormente en las 5 matas y en toda la UE, en los dos

bloques. Para determinar el rendimiento (kg/mata), relacionando el rendimiento promedio de las dos repeticiones por cada UE y se hizo el cálculo por hectárea.

2.5. Evaluación molecular

2.5.1. Extracción de ADN

La colecta del material vegetal se realizó de hojas tiernas y sanas, se siguió el protocolo del método CTAB 2X (hexadecil bromuro de trimetil amonio) (Doyle y Doyle, 1990), modificado por CIP (1998).

2.5.2. Cantidad y calidad de ADN

Por densitometría (electroforesis), para esta evaluación se preparó un gel de agarosa al 1% (80mL de buffer TBE1X + 2 µL de BrEt.), se trabajó con un gel pequeño, los pocillos se llenaron con las muestras del cocktail de corrida (2 µL de NFW + 1µL de loading 6X + 3 µL de ADN) se realizó electroforesis (90V, 70A, 60´) con buffer de corrida TBE1X, finalmente se procedió a observar bandas de ADN en el transiluminador.

Por espectrofotometría para realizar el cálculo de la absorbancia se usó bioespectrofotómetro de la marca Eppendorf, usando el protocolo estandarizado del Laboratorio de Genética y Biotecnología Vegetal de la Escuela Profesional de Agronomía UNSCH, Se disolvió el pellet extraído de ADN con 150 µL de T10E1, y se incubó a 37°C/1h, se realizó blanqueo con 1.0 – 1.5 µL de T10E1, realizar rotación leve (turn over) a las muestras de ADN, luego se extrajo 1.5 µL de muestra y se hizo la lectura en el espectrofotómetro (lectura en ng/µL), luego de la lectura se limpió el lente objetivo con papel toalla y se repitió el paso dos (el blanqueo solo es necesario cada 10 lecturas).

2.5.3. Marcadores moleculares y PCR punto final

Se utilizó un primer específico para identificar el gen *Sen2*, usados por Plich (2018).

Tabla 2

Primer para identificación de genes de resistencia a Synchytrium endobioticum

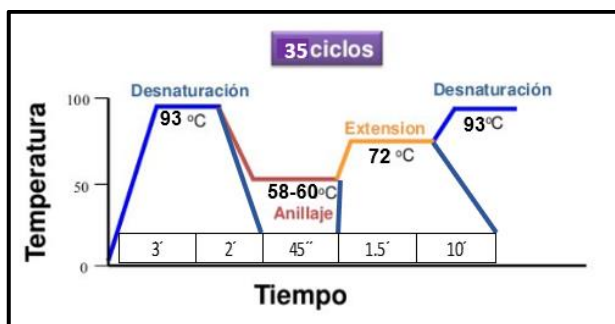
Marcador	Cebador	T° A (°C)	Tamaño (pb)	Protocolo
5450_3	F: ATGATCATTGATGGCAGCAG R: GGGCATTTTGGAGCATAAAA	58	1046	PCR

Los primers se diluyeron a una concentración de 10uM, se conservó a -20°C, el master mix se muestra en la Tabla 3, y el perfil térmico en la Figura 1.

Tabla 3*Master mix para gen Sen2*

Reactivos	Volumen
NFW	2.74 uL
Buffer 5x	2.0 uL
MgCl ₂	2.0 uL
dNTPs	0.20 uL
F [10uM]	1.0 uL
R [10uM]	1.0uL
Taq DNA polimerasa	0.06 uL
DNA molde (20 ng/uL)	1.0 uL
V total	10.0 uL

Nota: Antecedentes F y R tomados de Plich et al., 2018 y Przetakiewicz 2015

Figura 1*Perfil térmico PCR, para el gen Sen2.***2.5.4. Electroforesis productos PCR**

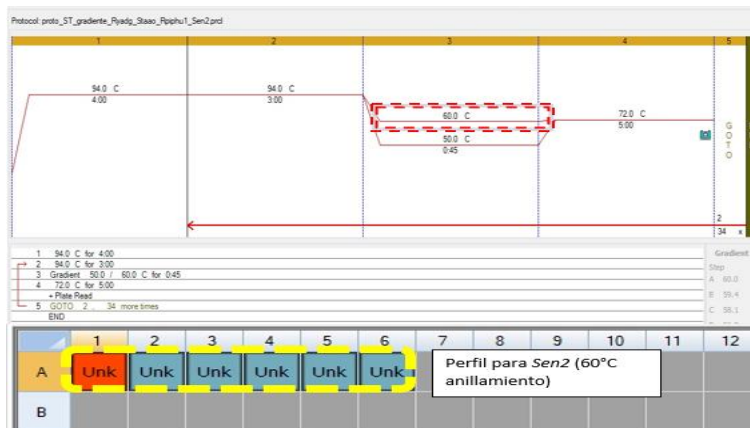
Se preparó un cocktail de corrida con (2uLNFW+3 uLprod.PCR+1uL Loading6X; para el Ladder: 1 uLLambda+4uLNFW + 1uL Loading6X) se procedió a correr mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% (1,8g de agarosa, se agregó TBE hasta volumen de 90mL, se dejó enfriar y se agregó 2.5 uL de BrEt), a 90V/70A durante 60minutos, luego estos fueron fotodocumentados para visualizar los fragmentos de ADN.

2.5.5. PCR tiempo real (qPCR)

Para ratificar las accesiones portadoras del gen *Sen2* (63, 30 y 16) del PCR punto final; fueron analizados en el termociclador tiempo real, el master mix fue preparado mezclando 1Rx 10 uL HiSYBR (Sybergreen) [1X]; 2uL primer F[10uM] y 2uL primer R[10uM] y 4uL ADN molde [A:20 ng/uL; B: 10 ng/uL]; 2uL NFW, completando el volumen total de 20uL. Luego se diseñó un perfil térmico que se muestra en la Figura 2 siguiendo el protocolo estandarizado de (LGBV -UNSCH) para qPCR.

Figura 2

Perfil térmico qPCR y diseño de placa para gen Sen 2.



3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Extracción de ADN por espectrofotometría y densitometría

En la figura 3 y Tabla 4 se presentan los resultados de la calidad de ADN por densitometría en gel de agarosa al 2% y electroforesis horizontal. Se muestra la cantidad de ADN de las 64 accesiones de papas realizado por espectrofotometría, reportando concentraciones en el rango de 109.4 - 1691.1 ng/uL y una absorbancia (A260/A280) de 1.89 – 2.04 los cuales indican que se encuentran en el rango óptimo categorizado como ADN de buena calidad.

Tabla 4

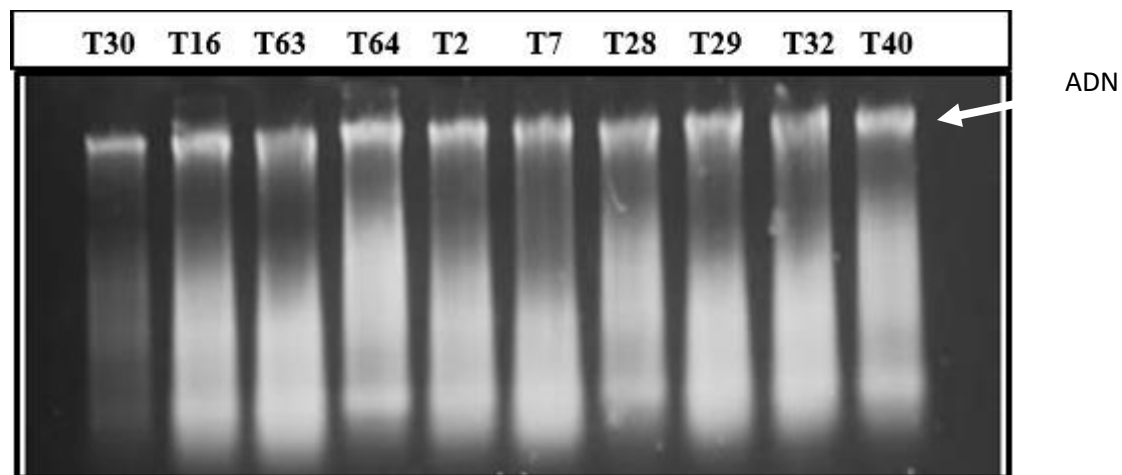
Resultados de cantidad (ng/uL) y calidad de ADN (A260/A280) por espectrofotometría.

ACCESIONES	[ADN ng/uL	A260/A280 1.8-2.0	ACCESIONES	[ADN ng/uL	A260/A280 1.8-2.0
01	702.70	1.96	33	1017.30	1.95
02	667.40	2.04	34	720.80	1.95
03	1088.40	1.94	35	352.10	2.02
04	479.20	1.97	36	817.40	1.94
05	553.50	2.02	37	639.10	1.93
06	1052.90	1.96	38	614.90	1.94
07	907.30	1.95	39	415.00	2.00
08	958.20	1.95	40	558.90	2.03
09	690.10	1.91	41	175.50	1.94
10	609.20	1.96	42	292.70	1.96
11	229.00	1.90	43	467.10	1.95
12	599.90	1.93	44	358.20	1.97
13	532.30	1.89	45	109.40	1.90

14	930.70	2.00	46	606.20	2.00
15	1064.70	1.96	47	1078.000	1.930
16	384.50	1.96	48	481.200	1.920
17	1259.60	2.01	49	802.600	1.50
18	1220.20	1.98	50	150.30	1.93
19	1167.30	1.99	51	203.40	1.97
20	1691.10	1.98	52	701.60	1.99
21	1066.40	2.00	53	389.80	2.02
22	1014.50	2.00	54	469.90	2.03
23	714.90	2.01	55	319.40	1.92
24	345.20	1.90	56	631.80	1.97
25	600.70	1.90	57	479.10	1.94
26	426.20	1.90	58	894.40	1.98
27	517.50	1.93	59	261.20	1.96
28	872.40	1.92	60	513.00	1.93
29	787.70	1.95	61	238.10	1.94
30	944.80	1.97	62	314.50	1.93
31	485.90	1.92	63	433.00	1.93
32	547.10	1.94	64	564.90	1.99

Figura 4

Resultados de calidad de ADN por densitometría



Nota: Control positivo accesiones diploides (+); muestra 1(T30), 5 (T2), 6 (T7), 7 (T28), 8 (T29), 9 (T32), 10 (T40) y control negativo (-) muestra 2 (T16), 3 (T63), 4 (T64).

3.2. Estandarización de PCR punto final con gradiente de temperaturas

La prueba para estandarización de PCR se realizó en 6 accesiones de papas diploides y como control positivo (portador del gen de resistencia) a la accesión 30 (Atuqpa papan) y como control negativo (susceptible, sin el gen de resistencia) a la accesión 63 (Yungay), usando como antecedente el trabajo de Plich y Przetakiewicz (2015), se diseñó un perfil

térmico con gradiente de temperaturas de anillamiento desde 57°C hasta 60°C. El master mix se hizo con un volumen para 1Rx de 15 uL (2.96uL NFW; 3.0uL Buffer; 1.3 uL MgCl₂; 0.3dNTPs; 1.75uL F y R; 0.19uL Taq polimerasa y 4.0uL de ADN [20 ng/uL]) que se muestra en la tabla 3.2. la electroforesis se realizó en gel de agarosa al 2.0% corridos a 90V/70A/60'. Se hizo una nueva corrida PCR, para mejorar las condiciones a 60°C, se incremento el vol 1Rx a 20 uL (3.76uL NFW; 4.0uL Buffer 5X; 1.6 uL MgCl₂; 0.4dNTPs; 3.0 uL F y R; 0.24uL Taq polimerasa y 4.0uL de ADN [20 ng/uL]).

3.3. Prueba de PCR tiempo real qPCR

Para confirmar el resultado del producto PCR punto final, se optó por realizar un PCR en tiempo real (qPCR), ya que este es más sensible al ser un PCR cuantitativo, se obtuvo los siguientes resultados que se muestran en las Figuras 3.6., 3.7. y 3.8. y la Tabla 3.4.

Tabla 5

Resultado de los valores C_q obtenido en 3 accesiones (T16, T30 y T63) de papa luego de PCR tiempo real (qPCR).

Well	Sample	[ng/uL]	C _q	End RFU
01	16a	20.0	26.9	820
02	16b	10.0	25.74	576
03	30a	20.0	25.33	1123
04	30b	10.0	28.07	936
05	63a	20.0	27.27	549
06	63b	0.00	0.00	76.4

Nota, a=concentración de ADN [20 ng/uL]; b= concentración de ADN [10 ng/uL]

Figura 5

Curva de concentración de qPCR muestra 16a y 16b.

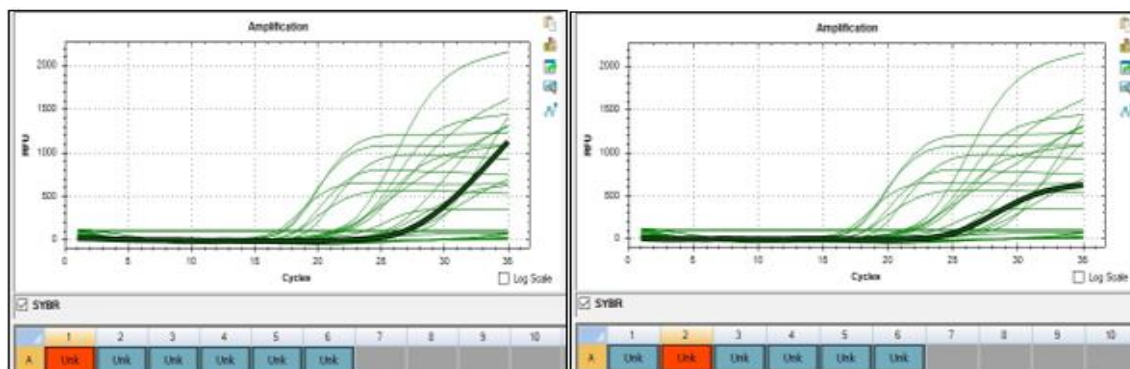


Figura 6

Curva de concentración de qPCR muestra 30a y 30b.

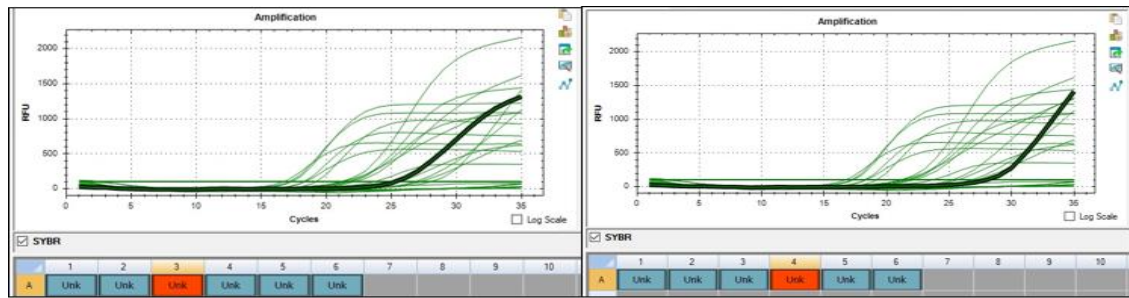
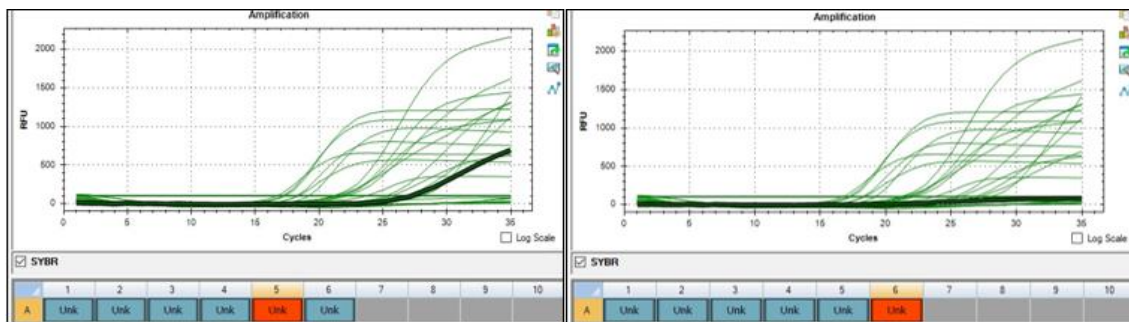


Figura 7

Curva de concentración de qPCR muestra 63a y 63b.



Nota: 63b control negativo (sin ADN)

En la Figura 7 la muestra 63b no se observa curva, no hay incremento en la concentración ya que no tiene ADN y por lo tanto no existe un PCR (prueba control).

3.4. Análisis de componentes de rendimiento

Usando el programa Rstudio versión R4.4.0 se realizó el análisis de varianza, se evaluó la eficiencia estadística, el coeficiente de varianza (CV) y la comparación de medias DLS, de los 64 tratamientos de papas nativas para los 5 parámetros ya descritos anteriormente. En la Tabla 3.5. Se muestra la eficiencia del diseño látice simple frente al bloque randomizado resultando 81.81% más eficiente que el diseño DBCR, siendo este un buen indicativo estadístico; y el C.V. varía entre 8.07% a 35.96% el cual está dentro del rango permisible para este tipo de investigación. En la Tabla 3.5. Se muestra el ANOVA de las 5 variables cuantitativas de rendimiento: diámetro de follaje, altura de planta, número de tallos, número de tubérculos por mata y kilogramos por hectárea. Se observa que entre los tratamientos por unidad ajustada existe diferencia estadística altamente significativa para los valores de diámetro de follaje (cm), altura de planta (cm) y rendimiento (Kg/ha) ($p < 0.001$); en tanto que los valores del número de tallos y tubérculos por mata resultaron estadísticamente significativos ($p < 0.05$).

Tabla 6

Resultado del análisis de varianza (ANOVA) de los 5 parámetros de rendimiento en 64 accesiones de papas nativas, significación estadística de los cuadrados medios.

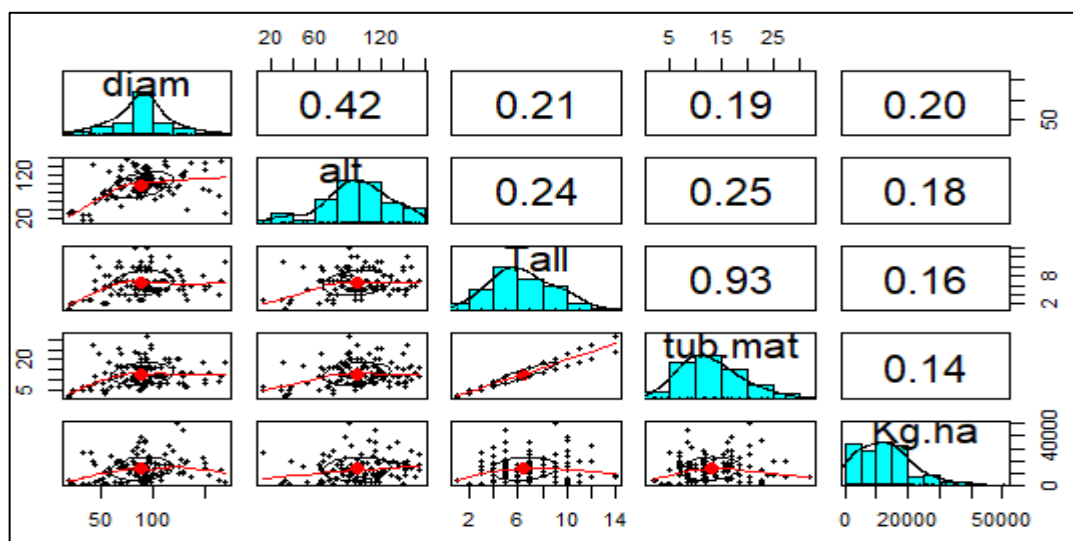
FV	Df	Cuadrados medios (Mean Sq)				
		Diámetro de follaje	Altura de planta	Numero de tallos	Tubérculos por mata	Kilogramos por hectárea
Bloque	1	52.53	85.51	0.3828	416.38***	8338660
Trat. Ajust	63	1773.82***	1282.00**	9.4046*	1.7713*	166380029***
Bloques incompletos (K)	14	35.74	893.73	1.004	22.09	16166605
Complementarios		cm	cm	Unid.	Unid.	Kg/ha
Eficiencia		0.81	0.81	0.81	0.81	0.81
CV		8.07	24.46	34.62	35.96	32.31
Media		88.79	97.90	6.49	12.8	13338.2
Máximo		169.75	155.57	14.0	31.92	50592
Mínimo		17.25	13	1.0	1.69	760.5

3.5. Correlación de los parámetros cuantitativos de rendimiento

La Figura 8 muestra la correlación que tiene cada par de parámetros, siendo los más relacionados los parámetros número de tallos y tubérculos/mata en un ($r=0.93$), lo cual indica que a mayor número de tallos incrementara de manera directa los tubérculos por mata, seguidas de la correlación del diámetro de follaje y la altura de planta ($r=0.42$), mientras que la altura de follaje y el número de tallos están correlacionados también positivamente ($r=0.24$), por último el parámetro de tubérculo/mata y kilogramos/hectárea ($r=0.14$); no se observa valores negativos de correlación, lo que indica que todos contribuyen al rendimiento.

Figura 8

Correlación de los 5 parámetros de rendimiento en 64 tratamientos de papas nativas.



Muñoz (2024) identificó que la mayor correlación fue entre tubérculos/mata y kilogramos/hectárea en un 72% mayor que la correlación (14%), pero la correlación de número de tallos y tubérculos/mata en este trabajo es mayor (93%) que fue reportado por Muñoz (29.7%). Tratándose de las mismas accesiones sembradas, la diferencia se expresa en el fenotipo, ya que en este trabajo fueron sembradas a menor altitud y en otras condiciones climatológicas.

4. CONCLUSIONES

1. El protocolo estandarizado PCR punto final para el gen *Sen2* resistente a *Synchytrium endobioticum* consta de un Master mix con volumen de 20uL 1Rx (3.76uL NFW; 4.0uL Buffer; 1.6 uL $MgCl_2$; 0.4dNTPs; 3.0uL del primer F y 3.0uL del primer R; 0.24uL Taq polimerasa y 4.0uL de ADN [20 ng/uL]); el perfil térmico consta de 35 ciclos (T° calentamiento $93^\circ C$ por 3 minutos, Denaturación $93^\circ C$ por 4 minutos, Annealing $60^\circ C$ por 45 segundos, Extensión $72^\circ C$ por minuto y medio, y extensión final de $72^\circ C$ por 10 minutos) visualizadas en gel de agarosa al 2% corridos 90V/70A/60'. Y para PCR tiempo real 1Rx de 10uL HiSYBR (Sybergreen) [1X]; 2uL primer F [10uM] y 2uL primer R [10uM] y 4uL ADN molde [A:20 ng/uL; B: 10 ng/uL]; 2uL NFW, completando el volumen total de 20uL con el mismo perfil térmico.
2. A condiciones ambientales de 2756 m.s.n.m las papas nativas presentaron: valores de diámetro de follaje de 18.58cm hasta 166.0cm (T30 "Atuq papan" y T33 "PN5" respectivamente); la altura de planta fue de 13.14cm hasta 145.9cm (T44 "Huamanpa uman2" y T55 "PN8" respectivamente); el número de tallos fue de 0.98 unidades/mata hasta 14.12 unidades/mata (T30 "Atuq papan" y T37 "Camotillo"); el número de tubérculos/mata fue de 1.96 tubérculos/mata hasta 27.89 tubérculos/mata (T30 "Atuq papan" y T37 "Camotillo" respectivamente); el rendimiento mínimo fue de 600.38 kg/ha hasta un máximo de 47571 kg/ha (T15 "Puka sawinto" y T63 "Yungay" respectivamente). Los componentes de rendimiento que más influyeron son diámetro de follaje ($r=0.2$)>altura de planta ($r=0.18$)>el número de tubérculos/mata ($r=0.16$)>peso de tubérculos kg/ha ($r=0.14$); los parámetros más correlacionados son número de tallos y tubérculos por mata ($r=0.93$), teniendo una relación directamente proporcional.

5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Diario Oficial de la Unión Europea. (2022, July 11). *medidas para erradicar y prevenir la propagación de Synchytrium endobioticum (Schilbersky) Percival*. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/PDF/?uri=CELEX:32022R1195>
- European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO). (2017a). PM 3/59 (3) *Synchytrium endobioticum*: descheduling of previously infested plots. *EPPO Bulletin*, 47(3), 366–368. <https://doi.org/10.1111/epp.12409>
- European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO). (2017b). PM 7/28 (2) *Synchytrium endobioticum*. In *EPPO Bulletin* (Vol. 47, Issue 3). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/epp.12441>
- Gabriel, J., Veramendi, S., Pinto, L., Pariente, L., & Angulo, A. (2016). Asociaciones de marcadores moleculares con la resistencia a enfermedades, caracteres morfológicos y agronómicos en familias diploides de papa (*Solanum tuberosum* L.). *Revista Colombiana de Biotecnología*, 18(1), 17–32. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v18n1.57712>
- Gob.pe, 2024. Producción de papa aumentó 16,7% a nivel nacional y cinco departamentos aportaron el 60,9% del total en marzo de 2024. Recuperada en: <https://www.gob.pe/institucion/inei/noticias/961162-produccion-de-papa-aumento-16-7-a-nivel-nacional-y-cinco-departamentos-aportaron-el-60-9-del-total-en-marzo-de-2024>
- International Potato Center (CIP). (2022). Datos y cifras de la papa. <https://www.fao.org/4/i1127e/i1127e.pdf>
- International Potato Center (CIP). (2022). Papas para mejorar los ingresos de los productores peruanos. Recuperada en: <https://cipotato.org/es/blog-es/papas-mejorar-ingresos-productores-peruanos/>
- Misarayme C, F. (2018). *Evaluación morfológica y rendimiento de diez accesiones de papa nativa (Solanum spp), a 4300 m.s.n.m. Vinchos – Ayacucho – 2016*. https://repositorio.unsch.edu.pe/bitstream/UNSCH/3091/1/TESIS%20AG1220_Mis.pdf
- Muñoz D, R. E. (2024). *Caracterización y selección molecular de accesiones de Papas Nativas (Solanum spp.) con genes para resistencia a Phytophthora infestans, La Mar, Ayacucho, 2022* [Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga Facultad de Ciencias Agrarias Escuela Profesional de Agronomía].

<https://repositorio.unsch.edu.pe/server/api/core/bitstreams/2a98adf4-b679-4f6b-89f1-0694d2566680/content>

- Obidiegwu, J. (2014). Manejo de la verruga de la papa: una revisión del estado actual de la investigación y perspectivas futuras. *Theor Appl Genet*, 763–780.
- Obidiegwu, J. E., Flath, K., & Gebhardt, C. (2014). Managing potato wart: A review of present research status and future perspective. *Springer*, 127(4), 763–780. <https://doi.org/10.1007/s00122-014-2268-0>
- Plich, J., Przetakiewicz, J., Śliwka, J., Flis, B., Wasilewicz-Flis, I., & Zimnoch-Guzowska, E. (2018). Novel gene *Sen2* conferring broad-spectrum resistance to *Synchytrium endobioticum* mapped to potato chromosome XI. *Theoretical and Applied Genetics*, 131(11), 2321–2331. <https://doi.org/10.1007/s00122-018-3154-y>
- Przetakiewicz, J. (2015). The Viability of Winter Sporangia of *Synchytrium endobioticum* (Schilb.) Perc. from Poland. *American Journal of Potato Research*, 92(6), 704–708. <https://doi.org/10.1007/s12230-015-9480-6>
- Torres, H. (2002). *Manual de las enfermedades más importantes de la papa en el Perú*. Centro Internacional de la Papa.

**UNSCH**FACULTAD DE CIENCIAS
AGRARIAS**ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS**
Bach. LUIS ENRIQUE VARGAS CORDOVA**R.D. N° 219-2024-UNSCH-FCA-D**

En la ciudad de Ayacucho a los veinte días del mes de agosto del año dos mil veinticuatro, siendo las dieciocho con treinta horas, se reunieron en el auditorio de la Facultad de Ciencias Agrarias, bajo la presidencia del Dr. Felipe Escobar Ramírez Decano de la Facultad de Ciencias Agrarias; los miembros del jurado conformado por Ph.D. Nery Luz Santillana Villanueva, Ph.D. Germán Fernando De La Cruz Lapa como asesor, M.Sc. Walter Augusto Mateu Mateo y el M.Sc. Guillermo Carrasco Aquino; actuando como secretario de actas el Mtro. Rodolfo Alca Mendoza, para recibir la sustentación de la Tesis titulado: **Estandarización de PCR "gen Sen2" de resistencia a *Synchytrium endobioticum* y componentes de rendimiento en papas nativas, Pampa del Arco, Ayacucho 2756 m.s.n.m.**, para obtener el Título Profesional de Ingeniero Agrónomo presentado por el Bachiller **LUIS ENRIQUE VARGAS CORDOVA**

El señor Decano, previa verificación de los documentos exigidos solicitó se proceda con la sustentación y posterior defensa de la tesis en un periodo de cuarenta y cinco minutos de acuerdo al reglamento de grados y títulos vigente. Terminado la exposición, los miembros del Jurado, formularon sus preguntas, aclaraciones y/o observaciones correspondientes. Luego se invito a los miembros del jurado pasar a otra aula para la deliberación y calificación del trabajo de tesis, teniendo el siguiente resultado:

Jurado evaluador	Exposición	Respuestas a las preguntas	Generación de conocimiento	Promedio
Ph.D. Nery Luz Santillana Villanueva	16	15	16	16
Ph.D. Germán Fernando De La Cruz Lapa	18	18	19	18
M.Sc. Walter Augusto Mateu Mateo	17	17	17	17
M.Sc. Guillermo Carrasco Aquino	15	15	16	15
PROMEDIO GENERAL				17

Acto seguido se invita a la sustentante y publico en general para dar a conocer el resultado final. Firman el acta.


Ph.D. Nery Luz Santillana Villanueva
Presidente


Ph.D. Germán Fernando De La Cruz Lapa
Asesor


M.Sc. Walter Augusto Mateu Mateo
Jurado


M.Sc. Guillermo Carrasco Aquino
Jurado


Mtro. Rodolfo Alca Mendoza
Secretario Docente

**UNSCH**FACULTAD DE CIENCIAS
AGRARIAS

CONSTANCIA DE CONTROL DE ORIGINALIDAD DE TRABAJO DE TESIS

El que suscribe coordinador responsable de la valoración y verificación de originalidad de los trabajos de investigación y de tesis de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, designado mediante la RCF N° 005-2024-UNSCH-FCA-CF; hace constar que el trabajo de tesis titulado;

Estandarización de PCR “gen Sen2” de resistencia a *Synchytrium endobioticum* y componentes de rendimiento en papas nativas, Pampa del Arco, Ayacucho 2756 m.s.n.m.

Autor : Luis Enrique Vargas Cordova
Asesor : Germán F. De La Cruz Lapa

Ha sido sometido al control de originalidad mediante el software TURNITIN UNSCH, acorde al Reglamento de originalidad de trabajos de investigación, aprobado mediante RCU N° 039-2021-UNSCH-CU, y RCU N° 1530-2023-UNSCH-CU, emitiendo un resultado de **catorce (14 %)** de índice de similitud, realizado con **depósito de trabajos estándar**.

En consecuencia, se otorga la presente Constancia de Originalidad para los fines pertinentes.

Nota: Se adjunta el resultado con Identificador de la entrega: 2436774726

Ayacucho, 23 de agosto de 2024

UNIVERSIDAD NACIONAL DE
SAN CRISTÓBAL DE HUAMANGA
Facultad de Ciencias Agrarias
Dr. Yuri Gálvez Gastelú
Coordinador de Control de originalidad de

Estandarización de PCR “gen Sen2” de resistencia a *Synchytrium endobioticum* y componentes de rendimiento en papas nativas, Pampa del Arco, Ayacucho 2756 m.s.n.m.

por Luis Enrique Vargas Cordova

Fecha de entrega: 23-ago-2024 09:21a.m. (UTC-0500)

Identificador de la entrega: 2436774726

Nombre del archivo: borrador_corregido_S._edobioticum.docx (7.87M)

Total de palabras: 15922

Total de caracteres: 88156

Estandarización de PCR “gen Sen2” de resistencia a Synchytrium endobioticum y componentes de rendimiento en papas nativas, Pampa del Arco, Ayacucho 2756 m.s.n.m.

INFORME DE ORIGINALIDAD

14%	14%	1%	10%
INDICE DE SIMILITUD	FUENTES DE INTERNET	PUBLICACIONES	TRABAJS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	Submitted to Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga	8%
	Trabajo del estudiante	
2	repositorio.unsch.edu.pe	3%
	Fuente de Internet	
3	repositorio.unc.edu.pe	1%
	Fuente de Internet	
4	docobook.com	<1%
	Fuente de Internet	
5	link.springer.com	<1%
	Fuente de Internet	
6	repositorio.ug.edu.ec	<1%
	Fuente de Internet	
7	Adamski, Andrew J.. "Simple Organic Fertilizer Amendments for Farming in Degraded Soils: Effects on Plant-Microbe Interactions", Northern Michigan University, 2024	<1%
	Publicación	

8	aprobemosjuntos.wordpress.com Fuente de Internet	<1 %
9	repositorio.unal.edu.co Fuente de Internet	<1 %
10	repositorio.inia.gob.pe Fuente de Internet	<1 %
11	www.christmaspace.com Fuente de Internet	<1 %
12	www.pacal.org Fuente de Internet	<1 %
13	www.nrahq.org Fuente de Internet	<1 %
14	www.studocu.com Fuente de Internet	<1 %

Excluir citas

Activo

Excluir coincidencias < 30 words

Excluir bibliografía

Activo