

**UNIVERSIDAD RICARDO PALMA**  
**ESCUELA DE POSGRADO**

**MAESTRÍA EN ECOLOGÍA Y GESTIÓN AMBIENTAL**



Tesis para optar el Grado Académico de Maestra en Ecología y  
Gestión Ambiental

Estructura y Diversidad Genética de *Puya raimondii* Harms  
“El gigante de los Andes Peruanos”

Autor: Bach. Tumi Calisaya, Milagros Liscely

Asesor: Dra. Betty Millán Salazar

LIMA-PERÚ

**2021**

## **PÁGINA DEL JURADO**

## DEDICATORIA

Dedico con todo mí ser existencial y espiritual a mis grandes motores de mi vida y fuentes de inspiración, mi adorada familia, quienes con su amor y dedicación me enseñaron el camino de luz, el camino de mis sueños.

A mi madre Mery, por llenarme de tanto amor y motivación para cumplir mis objetivos de vida.

A mi padre Julio, por ser fuente de disciplina y perseverancia.

A mi maravillosa hermana Arelis, mi fiel compañera de vida.

A mi hermano Jhosseth, por alentarme en seguir adelante.

A mi sobrino Andrei, el regalo más bello de la vida, su sonrisa me llena de luz.

A mi mamá Lucila, mi ángel que guía mis pasos, llevo conmigo la promesa que hice al partir.

## AGRADECIMIENTO

- Un agradecimiento eterno a mi familia por todo su esfuerzo, amor y enseñanzas de vida.
- De manera muy especial a mi asesora externa y consejera de vida, M.Sc. Mery Suni, por toda su dedicación, motivación y por ser fuente de inspiración en el camino de la investigación.
- A mi asesora, Dra. Betty Millán, a quién respeto y admiro, por apoyarme y orientarme en el desarrollo y culminación del presente estudio.
- Gratitud eterna a la especie *Puya raimondii*, quién me permitió conocer el maravilloso mundo de la conservación.
- Al Dr. Xue-Jun-Ge por depositar su confianza y darme la oportunidad de realizar la parte experimental del estudio en el South China Botanical Garden, de quién he aprendido mucho.
- A los integrantes del Laboratorio de Fisiología Vegetal, mi segunda familia: Giovana, Gerson, Jean, Karen, Kelly y Betty, César y Rocio por ser parte de todos los viajes de aventura y por sus consejos en el desarrollo de la Tesis.
- A los integrantes del laboratorio de Ecología Molecular del South China Botanical Garden: Xuo-Yong, Zhang Yuqu, Zheng, Liem y Sofía por todo su apoyo.
- A mi adorada familia REGENEC 2018 dónde conocí personas maravillosas que me enseñaron y motivaron, dándome las herramientas para comprender el mundo de la Genética para la Conservación, siempre las llevaré conmigo.
- A la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos por ser parte de las gestiones del convenio con South China Botanical Garden y por despertar en mí el amor en las ciencias.
- A Gerson, Jean y Karen por el apoyo brindado en la colecta de muestras en el departamento de Junín y Puno.
- A Alfredo Berrocal por sus orientaciones en el análisis y consejos durante el desarrollo de la Tesis.
- A la Dra. Mónica Arakaki, a quién respeto y admiro, por todo sus enseñanzas y orientación en su Laboratorio de Sistemática y Diversidad Vegetal del Museo de Historia Natural-UNMSM.
- A mis profesores de la Maestría de Ecología y Gestión Ambiental, por todas las enseñanzas y motivación, quienes despertaron en mí el interés en ser parte de la toma de decisiones, en especial a la Dra. Yabar por todas las orientaciones y su dedicación en el Proyecto de Tesis.
- Al SERFOR, por dar las facilidades con los permisos de colecta, que fueron de mucha ayuda para el estudio.
- A la Academia de Ciencias de China por todas las gestiones y apoyo económico en la pasantía de investigación.
- A todos mis amigos por sus ánimos y por escucharme cuando les contaba con mucha emoción la Tesis, en especial a Goa.

# ÍNDICE DE CONTENIDO

<b>PÁGINA DEL JURADO</b> .....	II
<b>DEDICATORIA</b> .....	III
<b>AGRADECIMIENTO</b> .....	IV
<b>ÍNDICE DE CONTENIDO</b> .....	V
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	IX
<b>RESUMEN</b> .....	XI
<b>ABSTRACT</b> .....	XII
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>CAPÍTULO I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b> .....	4
<b>1.1. Descripción del Problema</b> .....	4
<b>1.2. Formulación del Problema</b> .....	6
1.2.1. Problema general: .....	6
1.2.2. Problemas específicos: .....	6
<b>1.3. Importancia y Justificación del Estudio</b> .....	7
<b>1.4. Delimitación del estudio</b> .....	9
<b>1.5. Objetivos de la Investigación</b> .....	9
1.5.1. General .....	9
1.5.2. Específico .....	9
<b>CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO</b> .....	10
<b>2.1. Marco histórico</b> .....	10
<b>2.2. Investigaciones relacionadas con el tema</b> .....	13
<b>2.3. Estructura teórica y científica que sustenta el estudio</b> .....	17
2.3.1. Teoría genética de la selección natural .....	17
2.3.2. Teoría de la evolución .....	17
2.3.3. Equilibrio de Hardy – Weinberg .....	18
2.3.4. Estructura genética .....	19
2.3.5. AMOVA .....	20
2.3.6. Estadístico F .....	20
2.3.7. Estadístico R .....	21
2.3.8. Delta K .....	21
2.3.9. Teoría Ecológica del parchado .....	22
2.3.10. Teoría sobre los ecosistemas .....	22
<b>2.4.1. Descripción botánica de <i>Puya raimondii</i> Harms</b> .....	23
<b>2.4.2. Población</b> .....	23

2.4.3. Marcadores moleculares microsatélites (SSR).....	23
2.4.4. Variabilidad genética.....	24
2.4.5. Diversidad genética.....	24
2.4.6. Estructura genética.....	24
2.4.7. Heterocigosidad.....	25
2.4.8. Índice de contenido polimórfico.....	25
2.4.9. AMOVA.....	26
2.4.10. Estadístico F.....	26
2.4.11. Estadístico R.....	26
2.4.12. Delta K.....	26
<b>2.6. Hipótesis:</b> .....	<b>27</b>
2.6.1. General.....	27
2.6.2. Específicas.....	27
<b>2.7. Variables: Dimensiones e indicadores</b> .....	<b>28</b>
<b>CAPÍTULO III: MARCO METODOLÓGICO</b> .....	<b>29</b>
<b>3.1. Tipo, método y diseño de la investigación</b> .....	<b>29</b>
<b>3.2. Población y muestra (escenario de estudio)</b> .....	<b>29</b>
3.2.1. Colecta de las muestras.....	32
<b>3.3. Técnicas e instrumentos de recolección de datos</b> .....	<b>35</b>
3.3.1. Desarrollo de marcadores SSR.....	35
3.3.2. Extracción de ADN genómico.....	35
3.3.3. Amplificación de los marcadores Microsatélites.....	36
<b>3.4. Análisis de los datos</b> .....	<b>38</b>
<b>CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS</b> .....	<b>40</b>
<b>4.1. Resultados</b> .....	<b>40</b>
4.1.1. Desarrollo de marcadores Microsatélites (SSR).....	40
4.1.2. Extracción de DNA.....	40
4.1.3. Amplificación de los marcadores Microsatélites.....	41
4.1.4. Medición de la diversidad genética.....	45
<b>4.1.4.1. Número de alelos (A)</b> .....	<b>45</b>
<b>4.1.4.2. Frecuencias alélicas</b> .....	<b>45</b>
<b>4.1.4.4. Índice de Contenido Polimórfico (PCI)</b> .....	<b>49</b>
<b>4.1.4.5. Heterocigosidad</b> .....	<b>50</b>
<b>4.1.4.6. Equilibrio Hardy-Weinberg (EHW)</b> .....	<b>53</b>
4.1.5. Análisis de la estructura poblacional.....	54
<b>4.1.5.1. AMOVA y Estadísticos F y R</b> .....	<b>54</b>

<b>4.1.5.2. Coeficiente de endogamia (<math>F_{IS}</math>)</b> .....	55
<b>4.1.5.3. Análisis de asignación a grupos</b> .....	56
<b>4.2. Análisis de resultados o discusión de resultados</b> .....	63
4.2.1. Extracción de DNA .....	64
4.2.2. Diseño de marcadores microsatélites (SSR) .....	64
4.2.3. Parámetros de diversidad genética .....	65
4.2.4. Análisis de estructura poblacional .....	69
<b>CONCLUSIONES</b> .....	73
<b>RECOMENDACIONES</b> .....	74
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	75
<b>ANEXOS</b> .....	82
<b>ANEXO 1: DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD</b> .....	83
<b>ANEXO 2: AUTORIZACIÓN DE CONSENTIMIENTO PARA REALIZAR LA INVESTIGACIÓN</b> .....	84
<b>ANEXO 3: MATRIZ DE CONSISTENCIA</b> .....	85
<b>ANEXO 4. PROTOCOLOS O INSTRUMENTOS UTILIZADOS</b> .....	87
<b>ANEXO 5. FORMATO DE INSTRUMENTOS O PROTOCOLOS UTILIZADOS</b> .....	90
Anexo 5.1. Ficha de campo para la recolección de muestras de herbario. ....	90
Anexo 5.2. Ficha de colecta para muestras de ADN .....	91
<b>ANEXO 6. TABLAS DE VALIDEZ</b> .....	92
Anexo 6.1. Lista de personas involucradas dentro del proyecto “Variabilidad genética y foliar de las poblaciones de <i>Puya raimondii</i> Harms”, producto del Convenio entre South China Botanical Garden de la Academia de Ciencias de China y la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos .....	92
Anexo 6.2. Registro de colecta para muestras de ADN. ....	93
Anexo 6.3. Característica de los 34 microsatélites monomórficos identificados en <i>Puya raimondii</i> .....	95
Anexo 6.4. Tablas de frecuencias alélicas registrada para los 12 marcadores SSR en las localidades Cachi, Huáscar, Lampa y Pachapaqui para <i>Puya raimondii</i> . ....	97
Anexo 6.5. Fotografías del ecosistema donde habita de <i>Puya raimondii</i> en las localidades de muestreo. ....	99

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla N° 1.</b> Variables (definición y operacionalización de variables: Dimensiones e indicadores) .....	28
<b>Tabla N° 2.</b> Ubicación de las localidades de <i>Puya raimondii</i> .....	29
<b>Tabla N° 3.</b> Número de vouchers de las especies depositadas en el Museo de Historia Natural .....	34
<b>Tabla N° 4.</b> Lista de marcadores microsatélites (SSR), fluoróforos y mezcla de marcadores para el análisis de polimorfismo en <i>P. raimondii</i> . ....	43
<b>Tabla N° 5.</b> Características de los 12 marcadores microsatélites (SRR) polimórficos identificados en <i>Puya raimondii</i> . ....	43
<b>Tabla N° 6.</b> Número de alelos para las poblaciones de Cachi, Huáscar, Choconchaca y Pachapaqui de <i>P. raimondii</i> .....	45
<b>Tabla N° 7.</b> Estimación de heterocigosidad observada, heterocigosidad esperada e índice de contenido polimórfico en la población total. ....	49
<b>Tabla N° 8.</b> Estimación de la heterocigosidad calculada para las poblaciones en estudio de <i>P. raimondii</i> , utilizando 12 loci. ....	51
<b>Tabla N° 9.</b> Estimación del número de alelos, heterocigosidad calculada para las especies relacionadas con <i>P. raimondii</i> . ....	52
<b>Tabla N° 10.</b> EHW evaluado para los doce locus en las poblaciones de Cachi, Huáscar, Choconchaca y Pachapaqui. ....	53
<b>Tabla N° 11.</b> Análisis de Varianza molecular (AMOVA), estadístico F y estadístico R calculado por el programa GenAIEX. ....	54
<b>Tabla N° 12.</b> Estimación del coeficiente de endogamia (FIS) total, por localidad y para cada locus .....	56
<b>Tabla N° 13.</b> Estimación de FIS para las poblaciones en estudio con el programa Genetix para el análisis de asignación de grupos .....	57
<b>Tabla N° 14.</b> Análisis de Varianza molecular (AMOVA), estadístico FST, FSC y FCT calculado por el programa Arlequin. ....	58
<b>Tabla N° 15.</b> Datos de STRUCTURE HARVESTER para las poblaciones asumidas, resaltando el mejor valor para K.....	62



## LISTA DE FIGURAS

- Figura N° 1.** Mapa geográfico de la distribución de *Puya raimondii* en el Perú. Los puntos verdes corresponden a los lugares donde se encuentra la especie, mediante Teledetección – Google Earth (G. Prado, 2019). El círculo azul, corresponde a la población de Choconchaca; círculo rojo y amarillo corresponden al sector Cachi y Huáscar respectivamente; finalmente el círculo purpura corresponde a la población de Pachapaqui. .... 30
- Figura N° 2.** A: Vista de Google Earth – escala 1:60000, área de color verde representa la distribución de *Puya raimondii* en la población de Pachapaqui, Aquia, Ancash; B: Individuos adultos y juveniles de *Puya raimondii* próxima a una carretera; C: Vista lateral de una parte de la población de Pachapaqui, Ancash. .... 31
- Figura N° 3.** A: Vista de Google Earth – escala 1:60000, las áreas verdes representan los sectores de Cachi y Huáscar, Yanacancha, Junín; B: Vista lateral de una sección del sector Huáscar, población Yanacancha, Junín; C: Vista frontal de una sección del sector Cachi, población Yanacancha, Junín. .... 31
- Figura N° 4.** A: Vista de Google Earth – escala 1:60000, las áreas rojas representan los sectores de la distribución de *Puya raimondii* en la población de Choconchaca, Lampa, Puno; B: Vista frontal de una sección de la población de Choconchaca, Lampa, Puno; C: Vista lateral de una sección de la población de Choconchaca, Lampa, Puno, acompañada de árboles de Queñual. .... 32
- Figura N° 5.** A: Registro de coordenadas geográficas a un individuo de *Puya raimondii*, B: Muestras foliares ..... 34
- Figura N° 6.** A: Proceso de extracción de ADN, B: Muestras trituradas con CTBA, C: Nitrógeno líquido para trituración de los fragmentos foliares. .... 36
- Figura N° 7.** A: Proceso de amplificación por PCR, B: Termociclador, C: Preparación de muestras para la electroforesis, D: Cámara electroforética..... 37
- Figura N° 8.** A y B: Imágenes de geles de agarosa al 1% donde se muestran celdas que representa individuos de *Puya raimondii*, las celdas con una banda más claras son las que presentan buena calidad de DNA, C: Imagen de gel de agarosa al 1% con celdas de una banda que presentan buena calidad de DNA, excepto

para la celda 7 y 9, D: Imagen de gel de agarosa al 1% donde muestra celdas con bandas no claras que presentan mala calidad de DNA.....	41
<b>Figura N° 9.</b> A: Imagen de los marcadores Microsatélites codificados, B: Imagen de gel de agarosa al 2% donde se muestran celdas con bandas no claras que no representa buenos marcadores SRR para <i>P. raimondii</i> , C y D: Imágenes de geles de agarosa al 2% con celdas de una banda que presentan buenos marcadores SSR para individuos de <i>Puya raimondii</i> .....	42
<b>Figura N° 10.</b> Ejemplo de Electroferogramas de microsatélites (SSR) obtenidos a partir del DNA de <i>Puya raimondii</i> usando el programa GeneMarker. A) Fluoróforo FAM, B) Fluoróforo HEX y C) Fluoróforo TAMRA.....	44
<b>Figura N° 11.</b> Distribución de las frecuencias alélicas de los loci <i>Puya</i> -002, 009, 065, 039, 012 y 046.....	47
<b>Figura N° 12.</b> Distribución de las frecuencias alélicas de los loci <i>Puya</i> -049, 069, 067, 016, 052 y 037.....	48
<b>Figura N° 13.</b> Estimación del PIC en la población total.....	50
<b>Figura N° 14.</b> Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) para la población Cachi-Yanacancha, Huáscar-Yanacancha, Choconchaca y Pachapaqui.....	55
<b>Figura N° 15.</b> Gráfico de la asignación de grupos en el espacio multivariado de las poblaciones en estudio para <i>Puya raimondii</i> .....	57
<b>Figura N° 16.</b> Análisis de estructuración por agrupamiento de las poblaciones, asumiendo $K=2$ y $K=4$ .....	60
<b>Figura N° 17.</b> Análisis de estructuración por agrupamiento de las poblaciones en línea para los 84 individuos, asumiendo $K=2$ y $K=4$ .....	61
<b>Figura N° 18.</b> Gráfico del parámetro Delta K donde muestra el mejor valor para K en la prueba STRUCTURE HARVESTER.....	62

## RESUMEN

En los Andes del Perú habita *Puya raimondii* donde se encontraron diferencias morfológicas (morfotipos) en las poblaciones, motivo que ha impulsado al desarrollo de marcadores microsatélites específicos para la especie. El objetivo de la investigación fue evaluar la diversidad genética y estructura genética de las poblaciones de Choconchaca (Puno), Pachapaqui (Ancash) y Yanacancha (Junín) para establecer futuras unidades de conservación. Los parámetros de diversidad genética utilizados incluyeron número de alelos (A), alelos exclusivos (AR), heterocigosidad observada (Ho), heterocigosidad esperada (He), índice de contenido polimórfico (PCI). Los resultados mostraron que 12 de los 46 loci microsatélites fueron polimórficos y todos aportan información en el análisis de la diversidad genética poblacional, el número total de A varió de 2-13, los valores He varió de 0-0.723 y Ho de 0-0.929, He promedio (0.217) de las poblaciones indicando una diversidad genética moderada a alta, siendo la población de Choconchaca la que presentó mayor diversidad alélica y mayor diversidad genética. La prueba de Hardy-Weinberg mostró que las poblaciones se encuentran en desequilibrio H-W, el análisis estadístico resultó con un 65 % de la variación genética a nivel poblacional y un valor de  $F_{ST}$  (0.426) y  $R_{ST}$  (0.650) que indican alta diferenciación genética entre las poblaciones con dos grupos genéticos ( $K=2$ ) que corresponden con los morfotipos del norte y sur del País. Los resultados aporta información útil para la creación de un área de conservación en el departamento de Puno y el ecosistema donde habita *P. raimondii*.

**Palabras clave:** Microsatélites, *Puya raimondii*, diversidad genética, estructura genética, morfotipos, conservación.

## ABSTRACT

In the Andes of Peru inhabit *Puya raimondii* where were found morphologic differences (morphotypes) in the populations, motive that has driven development of specific microsatellite markers for the specie. The objective of the research was to evaluate the genetic diversity and genetic structure of the population of Choconchaca (Puno), Pachapaqui (Ancash) and Yanacancha (Junín) to establish future conservation units. The genetic diversity parameters used included number of alleles (A), exclusive alleles (AR), observed heterozygosity (Ho), expected heterozygosity (He), polymorphic content index (PCI). The results showed that 12 of the 46 microsatellite loci were Polymorphic and all provide information in the analysis of population genetic diversity, the total number of A varied from 2-13, the He values varied from 0-0.723 and Ho from 0-0.929, average He of the populations (0.217) indicating moderate to high genetic diversity, being Choconchaca population presenting the highest allelic diversity and the major genetic diversity. The Hardy-Weinberg test showed that the populations are in HW imbalance, the statistical analysis resulted with 65% of genetic variation at population level and values of FST (0.426) and RST (0.650) that indicate high genetic differentiation between populations with two genetic groups (K=2) that correspond to the morphotypes of north and south of the country. The results provide useful information for the creation of conservation área in the Department of Puno and the ecosystem where *P. raimondii* inhabit.

**Keywords:** Microsatellite, *Puya raimondii*, genetic diversity, genetic structure, morphotypes, conservation.

## INTRODUCCIÓN

El Perú es considerado un País con gran biodiversidad y gran diversidad de ecosistemas, donde alberga parte de la Cordillera de los Andes, que es el sistema montañoso más extenso de la tierra, es fascinante y desafiante debido al impacto de los recientes trastornos geológicos recientes en la biota. Las latitudes complejas de los Andes son el hotspot de biodiversidad más importante del planeta, tanto en número de especies como en niveles de endemismo (Myers, N., R. A. Mittermeier, C. G. Mittermeier, 2000; Young, Ulloa, Luteyn, & Knapp, 2002). Dentro de los Andes del Perú habita una especie importante, *Puya raimondii* denominada como la "Reyna de los Andes" por Antonio Raimondi (1874) y también conocida como "Titanka". Esta planta alcanza una altura de aproximadamente 8 m, pero cuando florece puede alcanzar hasta 15 m (Rivera, 1985; Villiger, 1981). Esta especie monocárpica se distribuye entre 3000 y 4800 m de altitud (Raimondi, 1874; Venero G.J.L.; Hosting Raimer, 1986; Ibish et al., 1999) y alcanza una altura promedio de 8.3 m, pero puede alcanzar hasta 15 m (Rivera, 1985; Villiger, 1981). Las principales amenazas para su supervivencia son las perturbaciones antropogénicas del fuego por costumbres, creencias y accidental, también está la ganadería y la ganancia de tierras agrícolas (Hartman, 1981; Rivera, 1985; Vadillo et al., 2007; De La Cruz, 1999). Además, se encuentran las aves oportunistas que se alimentan de néctar en la etapa de floración y por insectos que afectan la maduración de las flores (Salinas et al., 2007); en consecuencia, en la etapa de fructificación, muchas frutas están dañadas, finalmente el cambio climático y la disminución de la diversidad genética.

La especie se encuentra distribuida desde el Norte hasta el Sur del Perú con un estimado de 800,000 individuos en Perú, y 30,000–35,000 individuos en Bolivia, la especie se considera en peligro de extinción (Lambe, 2009) y cumple un papel importante en el ecosistema como refugio, fuente de alimento y lugar de anidación de las aves (Dorst, 1956; Salinas et al. 2007). Además, los tamaños de población pequeños pueden reducir la diversidad genética debido a la endogamia, la deriva aleatoria y el flujo genético reducido (Ellstrand y Elam 1993; Hooftman y Diemer 2002). Las poblaciones de *Puya raimondii* se encuentran en lugares de difícil acceso (observación personal) y en suelos ácidos y en terrenos rocosos o pedregosos con pendientes moderadas a muy fuertes (Villiger, 1981).

Con respecto a los estudios genéticos en *Puya raimondii*, Sgorbati et al. (2004), analizaron la diversidad genética de 8 poblaciones y lo relacionaron con su biología reproductiva, utilizando tres marcadores (AFLP, cpSSR y RAPD) con el propósito de estimar los niveles de polimorfismo dentro y entre poblaciones e inferir la estructura genética y la evolución. Descubrieron que el genoma era extremadamente uniforme, y el análisis de conglomerados reveló un alto nivel de similitud genética entre las poblaciones, concluyendo que la especie no tiene suficiente variabilidad en su genoma para sobrevivir a la presión antropogénica y al cambio climático, a pesar de que la especie está adaptada a su ambiente hostil (Sgorbati et al., 2004). Mientras que Hormung-Leoni et al., 2013, reportó en el Parque Nacional Huascarán y áreas vecinas, la variación genética en las poblaciones de *Puya raimondii* usando el marcador AFLP. Analizando 172 bandas, encontrando que 136 (79.1%) eran polimórficas, lo que indica que hay variación genética entre las poblaciones estudiadas. Además, se han reportado diferencias morfológicas en el número de espinas de la parte apical de las hojas en 15 poblaciones del centro y sur del Perú (Vadillo, 2011). Ambas investigaciones no tienen respuestas concluyentes; por lo que se necesita más información a nivel molecular para establecer si existe variabilidad genética entre las poblaciones de *Puya raimondii*, por tanto, hay una necesidad urgente de desarrollar marcadores genéticos específicos que puedan usarse para tomar decisiones en temas de conservación, considerando los impactos ecológicos y el peligro potencial de extinción de *P. raimondii*.

La tecnología ahora se usa ampliamente en muchas áreas de la biología de la conservación, incluido el desarrollo de marcadores microsatélites para evaluar la estructura genética y diversidad genética de las poblaciones. En el presente trabajo utilizaremos "next-generation sequencing", es decir, la técnica del "genome skimming techniques" para desarrollar un conjunto de marcadores de microsatélites para *P. raimondii* que nos permita evaluar la diversidad genética y estructura genética de las poblaciones de Choconchaca (Puno), Pachapaqui (Ancash) y Yanacancha (Junín); ya que fenotípicamente se ha encontrado diferencias morfológicas en el número de espinas de la parte apical de la hoja entre las poblaciones de centro y sur de Perú (Vadillo, 2011) Además, porque hasta la actualidad no se tiene una respuesta concluyente si existe variabilidad genética de la especie en estudio, ambos análisis nos permitirán dar las bases para la Conservación de una especie emblemática del Perú, de tal forma que existan un sustento científico para establecer Unidades de Conservación regional y promover un

Plan Nacional de Conservación de *Puya raimondii* en el Perú, ya que hasta la actualidad sólo existen cuatro lugares donde protegen a la especie como el Santuario Nacional de Calipuy, La Libertad; Área de Conservación Regional Titankayocc, Ayacucho; Reserva Paisajística Nor Yauyos Cocha, Junín y finalmente el Parque Nacional Huascarán, Ancash; pero hasta el momento no existe un área de conservación regional en el sur del Perú.

# CAPÍTULO I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

## 1.1. Descripción del Problema

La biodiversidad está siendo severamente afectada por acciones sin precedentes sobre los ecosistemas, muchas de ellas por origen antropogénico, destacando el cambio de usos del suelo, alteración de los ciclos biogeoquímicos, destrucción y fragmentación de hábitats, introducción de especies exóticas y la alteración de las condiciones climáticas (Arico et al., 2005).

La gran biodiversidad va acompañada de una diversidad de Ecosistemas, como los Ecosistemas Andinos; en donde habita una especie emblemática del Perú, *Puya raimondii* Harms, que se encuentra amenazada y en categoría de en peligro de extinción por la Lista roja de especies amenazadas de la UCIN (Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza). La afectación es mayormente por acciones antropogénicas como la quema y tala de plantas por costumbres o creencias o accidentales, ganadería, ganancia de terreno agrícolas (Hartman, 1981); así como también en etapa de floración la presencia de aves oportunistas que se alimentan del néctar, pétalos y estambres afectando a la maduración de las flores (Salinas et al., 2007) en consecuencia en la etapa de fructificación muchos frutos son dañados, afectando el número de semillas formadas y dispersadas, pese a su alta dispersión de semillas, 11 millones de semillas aproximadamente, muy pocas llegan a germinar debido a los controladores naturales, requerimientos de luz y condiciones de humedad para germinar (Suní, Cano, y Vadillo 2001), una vez germinada el establecimiento de las plántulas es muy baja (Vadillo y Suní 2006).

Finalmente, porque hasta la actualidad no se tienen respuestas concluyentes y se necesita más información a nivel molecular para establecer si existe variabilidad genética entre las poblaciones de *Puya raimondii*, es decir, existe una necesidad urgente de desarrollar marcadores moleculares específicos para la especie que pueden usarse para evaluar mejor los impactos genéticos y ecológicos.

Así mismo por observaciones en campo se ha visto que las poblaciones de *P. raimondii* están siendo afectadas por actividades antrópicas como la minería, construcción de



carreteras, actividades agrícolas y ganaderas.

Vadillo (2004) menciona:

“ El efecto negativo del hombre en actividades como el pastoreo y la expansión de las zonas agrícolas, disminuyen aún más la posibilidad para su establecimiento ”.

El registro de las poblaciones que abarcan desde el norte, centro y sur del Perú, algunas descritas y registradas por Vadillo (2011), se han incrementado por estudios de Teledetección y uso del programa Google Earth, identificándose nuevas poblaciones como Choconchaca, departamento de Puno y la población de Cachi que es un sector de la población de Yanacancha, departamento de Junín; ambas poblaciones aún no se encuentran registradas en anteriores estudios.

Según Vadillo (2011):

“ La falta de conocimientos sobre el estado actual de las poblaciones, respecto a su abundancia y distribución de tallas no permite elaborar apropiadas estrategias para su conservación y protección de las poblaciones”.

Además, en la investigación realizada por Vadillo (2011) se describe dos morfotipos en la región Norte y Sur del Perú que se diferencian en el número de espinas de la región apical de la hoja; ambos morfotipos aún no se han diferenciado a nivel molecular; lo que determinaría la creación de nuevas Áreas de Conservación regional para *P. raimondii*.

A nivel genético como se describió aún existe un vacío de información molecular; es decir no se tiene una respuesta concluyente si existe variabilidad genética de la especie, por un lado se tiene el trabajo realizado Sgorbati (2004) encontrando que el genoma de *P. raimondii* fue extremadamente uniforme con un alto nivel de similaridad genética entre las poblaciones; y por otro lado se encuentra el estudio de Hormung-Leoni (2013) en el que se reportó variación genética entre las poblaciones del Parque Nacional Huascarán y sus áreas vecinas; ambos estudios emplearon marcadores que presentan desventajas, pero que en su tiempo fueron de uso difundido; y finalmente porque los estudios a nivel molecular en plantas, en muchos casos son complejos porque muchas de

las plantas tienen las características de ser poliploides, lo que hace más complejo el análisis de diversidad genética a nivel poblacional; un análisis molecular también involucra altos costos económicos, ya sea por el uso de reactivos y equipos e incluso el costo se incrementa si se diseñan marcadores moleculares específicos para una especie.

Finalmente, de no contar con planes de manejo de conservación regionales, ni con un Plan Nacional de Conservación de *Puya raimondii* en el Perú que consideren los estudios a nivel molecular para que podamos entender la diversidad genética de las poblaciones que servirá en la toma de decisiones en temas de Gestión de la Conservación, porque se ha visto y escuchado a los pobladores de las comunidades que habitan con la especie en estudio la falta de interés de las Autoridades en temas de Conservación.

## **1.2. Formulación del Problema**

### **1.2.1. Problema general:**

¿La diferenciación genética entre las poblaciones de *Puya raimondii* de Choconchaca (Puno), Pachapaqui (Ancash) y Yanacancha (Junín) tiene correspondencia con los morfotipos en el Norte y Sur de los Andes de Perú?

### **1.2.2. Problemas específicos:**

- ¿La estructura genética tiene correspondencia con los morfotipos de *Puya raimondii* en el Norte y Sur de los Andes de Perú?
- ¿Las poblaciones de *Puya raimondii* de Choconchaca (Puno), Pachapaqui (Ancash) y Yanacancha (Junín) presentan diversidad genética?
- ¿Cuáles serían las localidades para proponer futuras áreas de conservación para *Puya raimondii* en el Perú?

### 1.3. Importancia y Justificación del Estudio

La investigación brinda bases científicas para la conservación. En evaluaciones de diversidad genética mostró una estrecha base genética, lo que pondría en riesgo la extinción de la especie junto con el particular ecosistema que conforma en medio de los pajonales (Sgorbati et al., 2004).

La reducción de sus poblaciones no solo afecta a la especie en sí, sino también a su ecosistema debido a que *Puya raimondii* cumple funciones como servir de refugio, fuente de alimento y lugar de anidamiento de aves (Dorst, 1956; Salinas et al., 2007). Así como también los tamaños pequeños de la población pueden reducir la diversidad genética debido a la endogamia, la deriva aleatoria y el flujo de genes reducido (Ellstrand and Elam 1993; Hoofman y Diemer 2002). Por ende, la importancia de la conservación y restauración efectiva de especies amenazadas; el cual se basa en información crucial como la cuantificación de la diversidad genética y la relación genética entre poblaciones (Godefroid et al., 2011; Shapcott et al., 2017; Weeks et al., 2011); por lo cual el conocimiento genético adecuado es importante para las mejores prácticas en conservación y restauración potencial de la especie (Godefroid et al., 2011; Howard et al., 2016; Weeks et al., 2011).

Si bien es cierto, existe avances sobre la biología reproductiva; sin embargo, es necesario completar información molecular sobre una especie emblemática del Perú, categorizada en Peligro, según el Decreto supremo N°043-2006-AG y amenazada, según la Lista roja de la UCIN; considerada como una riqueza natural por presentar una de las inflorescencias más grandes del mundo vegetal. Además, porque las investigaciones realizadas a nivel molecular no tienen una respuesta concluyente acerca de la diversidad genética entre las poblaciones; y si existe correspondencia entre la estructura genética con los morfotipos de la región Norte y Sur de los Andes de Perú.

Además, porque permitirán comprender y complementar los estudios ecológicos de las poblaciones de *P. raimondii* que se tienen hasta la actualidad. Una forma para optimizar las mejores prácticas en conservación es el uso de marcadores moleculares como los microsatélites o secuencias simples repetidas (SSR) que son secuencias de ADN cortas y repetidas en tándem de 1–6 pares de bases de longitud que son ubicuas en los genomas

eucariotas. Las SSR tienen ventajas sobre varios otros marcadores porque son muy abundantes y polimórficos, heredados de forma dominante, analíticamente simple y fácil transferibles (Weber, 1990) y han sido ampliamente utilizados en estudios genómicos de plantas (He et al., 2003; Maksylewicz-kaul, 2012; Zhang, Gao, Li, & Qian, 2018). Al diseñar marcadores moleculares microsátélites SSR específicos para *Puya raimondii* permitirá calcular la diversidad y estructura genética de las poblaciones que servirán para futuras investigaciones con el objetivo de tomar decisiones para la creación de un Plan Nacional de Conservación de *Puya raimondii* en el Perú o futuras Áreas de Conservación Regional, siendo una especie considerada un “relicto fósil” de antiguas eras geológicas, existente en la actualidad sólo en los Andes peruanos, donde se desarrolla hasta los 4300 metros (Venero G.J.L.; Hosting Raimer, 1986).

Por otro lado, el proyecto de investigación permitirá verificar los resultados que se obtuvieron de los estudios de Sgorbati et al. (2004) y Hornung-Leoni et al. (2012), y analizar poblaciones que no han sido evaluados en estudios previos; por ende para la elección de las poblaciones se hará de manera estratégica, las cuales son: Choconchaca (Puno), Pachapaqui (Ancash) y Yanacancha (Junín); que se caracterizan por estar distanciadas geográficamente y separadas por barreras geográficas, donde el flujo genético no es continuo.

Finalmente, porque la investigación considera al recurso genético y el aspecto ecológico como una interacción, no sólo en términos de número, abundancia, composición y distribución espacial. Considerando que cada especie contribuye al funcionamiento de los ecosistemas, la naturaleza y magnitud de sus contribuciones individuales varían considerablemente en función del ecosistema o del proceso al que se haga referencia; por lo que los mecanismos que influyen en el funcionamiento de los ecosistemas están más relacionados con algunos caracteres funcionales de las especies, que con la riqueza específica (Chapin III, F. Stuart; Zavaleta, Erika S.; Eviner, Valerie T.; Naylor, Rosamond L.; Vitousek, Peter M.; Reynolds, Heather L.; Hooper, David U.; Lavorel, Sandra; Sala, Osvaldo E.; Hobbie, Sarah E.; Mack, Michelle C. & Díaz, 2005).

#### **1.4. Delimitación del estudio**

El estudio comprende tres poblaciones seleccionadas estratégicamente y distanciadas geográficamente con el objetivo que representen los morfotipos de Norte y Sur del Perú, además porque para las tres poblaciones se tiene los permisos correspondientes de colecta y exportación del Servicio Nacional Forestal y de Fauna Silvestre (SERFOR). La primera población corresponde a Choconchaca, ubicada en la provincia de Lampa, departamento Puno; la segunda población corresponde a Pachapaqui, ubicada en la provincia de Bolognesi, departamento de Ancash; y la tercera población corresponde a Yanacancha, ubicada en la provincia de Chupaca, departamento de Junín; donde se encuentran los sectores de Cachi y Huáscar.

#### **1.5. Objetivos de la Investigación**

##### **1.5.1. General**

Evaluar la diversidad genética y estructura genética en las poblaciones de Choconchaca (Puno), Pachapaqui (Ancash) y Yanacancha (Junín) para establecer unidades de conservación.

##### **1.5.2. Específico**

- ❖ Evaluar la correspondencia de la estructura y diversidad genética de *Puya raimondii* con sus morfotipos en los Andes de Perú en las poblaciones de Choconchaca (Puno), Pachapaqui (Ancash) y Yanacancha (Junín).
- ❖ Estimar el nivel de endogamia de las poblaciones de Choconchaca (Puno), Pachapaqui (Ancash) y Yanacancha (Junín) dentro del rango de distribución y en los Andes de Perú.
- ❖ Definir lineamientos base para la conservación de las poblaciones de *Puya raimondii* en los Andes de Perú.

## **CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO**

### **2.1. Marco histórico**

El estudio de investigación tiene como bases teóricas la ley de Hardy-Weinberg, que ha ido evolucionando con la Teoría de la Herencia Genética; el cual comienza en la década de 1850 en el que Darwin escribió un libro controversial e influyente llamado “El origen de las especies”. En él, propuso que las especies evolucionan y que todos los seres vivos pueden rastrear su ascendencia a un antepasado común. Según Futuyma (2004), la selección natural es el proceso por el cual una especie se adapta a su medio ambiente. La selección natural lleva al cambio evolucionario cuando individuos con ciertas características poseen una tasa de supervivencia o reproducción más alta que los otros individuos de la población y pasan estas características genéticas heredables a su progenie.

La selección natural es la diferencia consistente en la supervivencia y la reproducción entre genotipos diferentes, o hasta en genes diferentes, en lo que podríamos llamar el éxito reproductivo. Además, sin variación genética no puede haber evolución (Alonso & Darwin, 2000). De manera que debe haber mutación y a menudo recombinación para que se generen los diferentes genotipos o las diferentes versiones de los genes, conocidas como alelos, los cuales pueden o no colaborar en la habilidad de un organismo para sobrevivir o para reproducirse. Uno no puede tener cambio evolutivo sin las mutaciones, y quizás sin la recombinación, las cuales dan origen a la variación genética (Futuyma, 2004).

Otro avance en herencia genética fueron las Leyes de Mendel, donde explican y predicen cómo van a ser las características de un nuevo individuo, partiendo de los rasgos presentes en sus padres y abuelos. Los caracteres se heredan de padres a hijos, pero no siempre de forma directa, puesto que pueden ser dominantes o recesivos. Los caracteres dominantes se manifiestan siempre en todas las generaciones, pero los caracteres recesivos pueden permanecer latentes, sin desaparecer, para surgir y manifestarse en generaciones posteriores, seguidos por los siguientes principios:

1.- Principio de la uniformidad. Establece que, si se cruzan dos razas puras para un determinado carácter, los descendientes de la primera generación son todos iguales entre sí e iguales (en fenotipo) a uno de los progenitores.

2.- Principio de la segregación. Establece que los caracteres recesivos, al cruzar dos razas puras, quedan ocultos en la primera generación, reaparecen en la segunda en proporción de uno a tres respecto a los caracteres dominantes. Los individuos de la segunda generación que resultan de los híbridos de la primera generación son diferentes fenotípicamente unos de otros; esta variación se explica por la segregación de los alelos responsables de estos caracteres, que en un primer momento se encuentran juntos en el híbrido y que luego se separan entre los distintos gametos.

3.- Principio de la independencia de caracteres. Establece que los caracteres son independientes y se combinan al azar. En la transmisión de dos o más caracteres, cada par de alelos que controla un carácter se transmite de manera independiente de cualquier otro par de alelos que controlen otro carácter en la segunda generación, combinándose de todos los modos posibles.

El estudio de investigación también se sustenta en la Teoría Ecológica y la Teoría sobre los ecosistemas, las cuales surge del desarrollo histórico de la Ecología y según López (2008) no ha seguido una secuencia lineal de pensamiento, su origen ha sido múltiple, ligado a la evolución paralela de una serie de líneas científicas y temáticas con frecuencia dispares, por lo que ha conseguido ser una disciplina autónoma tras un considerable esfuerzo de abstracción, esquematizándose en:

- 1.-Ecología de los factores ambientales, Mesología o ecología del ambiente fisicoquímico.
- 2.-Ecología de poblaciones o Demografía.
- 3.-Ecología de las comunidades o biocenosis (Biocenología).
- 4.-Ecología de los sistemas.

Con respecto a la especie en estudio, *Puya raimondii* Harms, se tiene información del año 1867 en que el naturalista italiano Antonio Raimondi descubre poblaciones de esta especie en uno de sus viajes por los andes centrales, dándole el nombre de *Pourretia gigantea*. Luego de muchos años y estudios el botánico Harms le asigna el nombre de *Puya raimondii*, en honor al viajero y naturalista italiano. Desde entonces se han hecho muchos estudios acerca de esta especie propia de los andes americanos, especialmente en lo referente a su distribución, características botánicas, así como su ecología.

El área de distribución de esta especie está principalmente en los andes peruanos, llegando hasta una parte de Bolivia. Como parte de los numerosos intentos por conservar esta

especie y su hábitat, es que se crearon varias áreas naturales protegidas. Primero el Parque Nacional del Huascarán, establecido en 1975, el que considera como uno de sus objetivos principales la protección y preservación de esta planta, continuando con la publicación del libro Parques Nacionales del Perú, Dourojeanni y Ponce (1978) hacen mención de los bosques de *Puya raimondii* de Ayacucho, y reconocen la necesidad de considerar a Titankayocc como área protegida. En 1981 se crea el Santuario Nacional de Calipuy, en Santiago de Chuco, departamento de La Libertad, con el fin de preservar los rodales de *Puya raimondii* más grandes conocidos hasta ese año. Desde entonces, las zonas de esta especie no han sido dadas a conocer, quedando expuestos a amenazas y otros factores que pueden determinar la reducción significativa de esta especie.

La Embajada de Italia en Perú, por medio del Instituto Italiano de Cultura de Lima, y por iniciativa del Gobierno Peruano, lanzó en los años ‘90 un llamado de apoyo al Parque Nacional de Abruzzo, para la salvaguarda de una rara especie de planta andina la *Puya raimondii* Harms. En base a esto, el Comité Parques de Italia y la Asociación ERCI team, realizaron la expedición científico-naturalístico-deportiva denominada “salvemos la naturaleza” en la cual se pusieron las bases para el establecimiento de un Área de Conservación Regional en Ayacucho, la finalidad fue desarrollar una experiencia dirigida a la gestión de áreas protegidas y sus zonas de amortiguamiento que pudiera armonizar con la puesta en marcha de un proceso local de desarrollo alternativo sostenible con componentes ambientales.

En 1997 el Instituto Italiano de Cultura de Lima, lanzó una alarma acerca de la existencia del Bosque Titankayocc en Ayacucho, ubicado entre las localidades de Cochas, Ccachubamba, Pallcacancha, Illapascca, Chanchayllo, Raccaraccay y Quisuarcancha, en las provincias de Huamanga, distritos de Chiara, Vilacashuamán, y Vischongo. Debido a que este bosque, amenazado por el crecimiento desorganizado de las actividades agrícolas y urbanas, se solicitó la intervención del Centro Parques de Roma, el cual envió una misión científica encargada del diagnóstico de dicho bosque. Es así como en 1988 le asignan el título de Refugio Naturalístico Bosque de Titankayocc. A partir de este esfuerzo, el Instituto Nacional de Recursos Naturales de Ayacucho 1999 hace los intentos por conseguir la incorporación de Titankayocc al Sistema Nacional de Áreas Naturales Protegidas. Del mismo modo algunos organismos locales y no gubernamentales hacen los esfuerzos para la creación de dicha reserva.



Actualmente los bosques más grandes de *Puya raimondii* en el Perú se encuentran en el departamento de Ayacucho, en los lugares conocidos como Titankayoc, Cochas, Ccachubamba, Pallcacancha, Illapascca, Chanchayllo, Raccaraccay y Quisuarcancha, en las provincias de Huamanga, distrito de Chiara y Vilacashuamán, distrito de Vischongo. Según estudios realizados por la Universidad Nacional San Cristóbal de Huamanga, se sabe que estos rodales poseen una población de *Puya* mayor a los 600.000 ejemplares. El "bosque" más grande y conocido en la zona es el de Titankayoc, que con 1200 Has. de área de bosque posee ejemplares, superando inmensamente los 32.000 ejemplares del Parque Nacional del Huascarán y los 130.392 ejemplares reportados para el Santuario Nacional de Calipuy.

## **2.2. Investigaciones relacionadas con el tema**

Vadillo, G; Suni, M. & Roca, W. (2007) plantea como objetivo estimar la variabilidad molecular y morfológica de poblaciones naturales de *P. raimondii* representativas del territorio peruano, a través de marcadores moleculares AFLP y morfológicos.

Se obtuvo un registro, ubicación y evaluación de 15 poblaciones de *Puya raimondii*, donde han encontrado que la quema de plantas vegetativas e infrutescencias es una costumbre general en todos los lugares donde se encuentra *Puya raimondii*. La tala es poco frecuente en Apurímac. A nivel molecular se tuvo una buena amplificación con la mayoría de primers, 30 combinaciones; de las mejores amplificaciones, 13 combinaciones fueron muy monomórficas.

Las conclusiones más relevantes es la caracterización de las espinas, donde se encontró diferencias significativas entre poblaciones y departamentos; sin embargo, se aprecia mejor las diferencias a nivel de departamentos, encontrándose que las poblaciones de Huancavelica y Puno presentan hojas con las espinas más grandes, tanto en la parte apical como basal; mientras que las poblaciones de Junín y Apurímac tienen hojas con espinas de diámetro más grande, en tanto que las poblaciones de Lima poseen espinas de diámetro menor; así mismo describen que se tiene almacenado el material de ADN de las diferentes poblaciones en el Centro Internacional de la papa-CIP.

La investigación se difiere porque se evaluaron poblaciones distintas, uso del marcador

molecular y no tiene como variables la parte morfológica de la especie; sin embargo, tiene el mismo enfoque para la Conservación de *Puya raimondii* dentro del ecosistema andino donde habita.

S. Sgorbati, M. Labra, E. Grugni, G. Barcaccia, G. Galasso, U. Boni, M. Mucciarelli, S. Citterio, A. Benavides Iramátegui, L. Venero Gonzales, and S. Scannerini (2004) tiene como objetivo de investigación, analizar la diversidad genética de 8 poblaciones de *P. raimondii* y relacionaron con su biología reproductiva.

Trabajó con 20 individuos de cada población, la extracción de DNA se realizó en el Laboratorio de Farmacia y Bioquímica de la UNMSM, pero el análisis de marcadores y el flujo citométrico de las semillas se hizo en la universidad de Milano - Bicocca (Italia), se usaron tres marcadores (AFLP, cpSSR y RAPD) para estimar los niveles de polimorfismo dentro y entre las poblaciones e inferir la estructura genética; así como la evolución.

Encontró que el genoma de *Puya raimondii* fue extremadamente uniforme, sólo 23 de las 217 corridas con el marcador AFLP fueron polimórficas. Y el análisis clúster reveló un alto nivel de similaridad genética entre las poblaciones.

Al comparar con la presente investigación difiere, porque las poblaciones evaluadas son distintas y no mencionadas en el estudio de Sgorbati (2004), también porque no especifica el tamaño de los individuos de *Puya raimondii* en los que se realizó el muestreo; y la extracción del material genético lo realizó a nivel foliar y semillas. La similaridad se presenta en el uso de los marcadores moleculares (microsatélites); así como, la metodología para extraer el ADN genómico de la especie.

Hornung-Leoni, C.; Sosa, V.; Simpson, J.; Gil, K. (2012) su objetivo fue reportar la variación genética en poblaciones de *Puya raimondii* del parque Huascarán y sus áreas vecinas usando el marcador AFLP.

Dónde se encontró que las cuatro combinaciones de cebadores utilizadas en *P. raimondii* generaron un total de 172 bandas, de las cuales 136 loci, que representan el 79.1% del total, fueron polimórficas. Dos poblaciones del Parque Nacional Huascarán mostraron el nivel más alto de polimorfismo, con 96 y 130 loci polimórficos, respectivamente, lo que indica que la variación genética está presente en las poblaciones de *Puya raimondii*.

Al comparar con esta investigación, difieren por la elección de las poblaciones en estudio, para el estudio de Hornung-Leoni (2012) se evaluaron poblaciones no tan distantes geográficamente; a diferencia del presente estudio que se ha seleccionado poblaciones distantes; dos poblaciones del centro del Perú y una del sur con el objetivo de tener mayor distancia geográfica; también el tipo de marcador molecular. La similitud corresponde al objetivo de encontrar variabilidad genética de las poblaciones de *Puya raimondii*.

Salazar, J; & Villasante, F. (2012) plantea como objetivo determinar la distribución geográfica y la situación actual de *P. raimondii* en la Región de Arequipa, para que sirva de base biológica para la elaboración de planes de conservación y ecoturismo y así evitar que esta especie desaparezca de la región.

Los resultados más importantes consistieron en determinar el tamaño poblacional de *P. raimondii* para la Región de Arequipa; el cual sumó un total de 5.106 individuos. La población de Tururunka fue la más pequeña, con solo 127 individuos vivos. Asimismo, esta población fue la que presentó la menor densidad, con 5.08 ind/ha. Con respecto a la estructura poblacional por edades, los resultados muestran que las poblaciones de las 5 localidades presentan pirámides poblacionales en colapso (Odum et al., 2006), debido al bajo porcentaje de individuos tiernos, que varían del 5% al 27%, lo que indica que son poblaciones envejecidas, con tendencia a disminuir. Finalmente, con respecto a la situación actual de *P. raimondii*, se obtuvo, el valor global de la salud de las poblaciones en las seis localidades presentes de la Región Arequipa es “regular”, lo que indica que estas poblaciones se encuentran por debajo del estado deseado.

Al comparar con esta investigación se diferencia porque sólo se evaluó un departamento y seis poblaciones; mientras para el estudio se analizarán tres poblaciones, donde cada uno corresponde a un departamento distinto. La similitud corresponde sobre el estado de las poblaciones; considerando el estadio de plántula que complementan con los estudios de distribución biogeográfica en las poblaciones de *Puya raimondii*.

Salinas, L.; Arana, C.; Suni, M. (2007) su objetivo del estudio fue documentar la hipótesis de que las flores de las especies de *Puya* son importantes para los nectarívoros de grandes alturas en los Andes, donde se realizaron observaciones de picaflores en dos poblaciones de *Puya* ubicados por encima de los 3000 m de altitud, en el departamento de Ancash, Perú. En población de *Puya raimondii* del Parque Nacional Huascarán.

Los resultados más importantes describen sobre cuatro especies de Trochilidae (picaflores) que fueron avistadas. El total de estas especies se observaron alimentándose del néctar de *P. raimondii*, siendo: *Oreotrochilus stolzmanni*, *Patagona gigas*, *Aglaeactis cupripennis* y *Metallura phoebe*. De estas cuatro especies de Trochilidae, *Oreotrochilus stolzmanni* “estrella cabeciverde” fue la más frecuentemente avistada alimentándose del néctar de Puya (60% de 2420 avistamientos), del total de granos de polen observados en las muestras extraídas de picos y cabezas de los picaflores capturados, el 80% fueron de *Puya raimondii*. Lo que demuestra la importancia de esta planta como fuente de alimento para los picaflores y el rol de éstos como transportadores de los granos de polen para esta especie de Puya.

Al comparar con esta investigación, las diferencias se basan porque el estudio tiene diferente objetivo; sin embargo, da las bases para comprender sobre el flujo genético de las poblaciones; ya que hasta el momento no se tiene datos sobre la cantidad y calidad del néctar de estas especies y aún queda pendiente la documentación de la importancia de los picaflores en la reproducción de las especies de Puya que ayudan a la discusión para los resultados de la diversidad genética de las poblaciones.

Rivadeneira G., Ramsay P. M., Montúfar R. (2020) su objetivo determinar si los regímenes de incendios y el comportamiento de los colibríes modifica la estructura genética de la población para *Puya hamata* (Bromeliaceae) usando marcadores microsatélites.

Partiendo con la idea que naturalmente la dispersión deficiente da como resultado parches de plantas genéticamente relacionadas y que cuando se produce la quema, promueve la geminación de las plántulas alrededor de las plantas progenitoras que cuando florecen son parches atractivos para los colibríes que transportan polen de plantas probablemente no relacionadas. Los resultados fueron que las plantas individuales aisladas presentaron mayor heterocigosidad observada y las plantas adultas de parches grandes mostraron una heterocigosidad observada menor, la estructura genética de las semillas mostró un gradiente de diversidad más bajo en los centros de los parches, pero más alto en los bordes de los parches.

Al comparar con esta investigación, las diferencias se basan primero porque en el estudio se trabajó con otra especie y se comparó plantas adultas que se encontraban aisladas o en parches; también porque consideró semillas dentro de los parches relacionándolo con el

comportamiento de los colibríes como uno de los factores que restringen el flujo de genes dentro y fuera de parches o aquellos que mantienen la diversidad genética; es decir considera la diversidad genética a escala de paisaje.

### **2.3. Estructura teórica y científica que sustenta el estudio**

El estudio considera la historia de la genética de la conservación, antes se creía que la naturaleza era finita, los primeros trabajos comenzaron con Thomas Huxley (1833), defensor de la Teoría de Charles Darwin; y luego con Rachel L. Carson y su libro la "primavera silenciosa"(1962), considerado el primer trabajo de un Biólogo con gran impacto en la conservación, dónde luchó enormemente con el poderío económico, después llegó el primer trabajo genético para la conservación con Charles Darwin; y en 1983 apareció la primera vez la palabra genética para la conservación; si bien es cierto que los marcadores de ese tiempo eran poco variables, ya por los años 90 la situación cambió por el PCR y en 1996, John Avise, considerado el padre de la fitogeografía, resaltó la importancia de la historia natural. Después con Richard Frankham se inició la genética de la conservación y con Fred Allendorf la conservación y genética de las poblaciones, teniendo como base la teoría genética de la selección natural.

#### **2.3.1. Teoría genética de la selección natural**

La diversidad genética se encuentra sustentada en la Teoría genética de la selección natural, de acuerdo a esta teoría la pérdida de variabilidad genética de una especie reduce sus opciones evolutivas futuras o su potencial evolutivo que es; debido a lo anterior, una de las razones más importantes para conservar la diversidad genética es el mantenimiento del potencial evolutivo de las especies pues dicha diversidad representa el reservorio de las posibles respuestas al medio (físico y biológico), posibilitando con ello su adaptación a los cambios del mismo.

#### **2.3.2. Teoría de la evolución**

El número de alelos, la heterocigosidad y el índice de contenido polimórfico está en función de la teoría de evolución.

Herrera-paz (2013) afirma:

“La teoría de la evolución explicada a través de la moderna síntesis nos explica que en una población que habita determinado territorio, las proporciones de los alelos de los genes que determinan características adaptativas cambiarán con el tiempo, esto, de acuerdo con la acción del ambiente actuando en contra o a favor de dichas características”. (p. 42).

La afirmación describe la variación heredable en las poblaciones. Es decir, se basan en las diferencias de las características de los organismos en una población y en la capacidad de transmitir dichas características a su descendencia, la medición se suele usar también como una estimación de la variación genética, es decir, equivalente a la heterocigosidad. Debe tomarse en consideración que el estadístico depende mucho del tamaño poblacional ya que cuando mayor sea éste, mayor será la probabilidad de detectar alelos raros (AR, frecuencia  $<0.05$ ) o alelos muy raros (AmR, frecuencia  $<0.01$ ). Por tal motivo, este estadístico es considerado útil para estudios de variabilidad en los loci (Aranguren et al. 2005).

### **2.3.3. Equilibrio de Hardy – Weinberg**

En 1908 Godfrey Hardy y Wilhelm Weinberg formularon independientemente una relación que puede ser empleada para predecir frecuencias alélicas según las frecuencias genotípicas, o a la inversa, determinar frecuencias genotípicas según las frecuencias alélicas (Hamilton, 2009).

Según Freeland (2005) y Hamilton (2009):

“Una población que se encuentra en equilibrio de Hardy – Weinberg presenta ciertas características: la especie es diploide, presenta reproducción sexual, las generaciones son discretas, hay panmixia, es decir, la unión de los gametos se produce al azar, el tamaño de la población es grande, no hay migración, no hay mutaciones o su probabilidad es baja y no se afectada por selección natural” (p.15).

La utilidad práctica de este teorema reside en que podemos evaluar la magnitud del cambio evolutivo en las poblaciones analizadas comparando las frecuencias genotípicas estimadas en las poblaciones naturales que estudiamos con las que esperaríamos encontrar según el equilibrio Hardy-Weinberg. El teorema funciona como hipótesis nula y la genética de poblaciones consiste en gran medida en investigar qué factores provocan la desviación significativa de esta hipótesis nula en las poblaciones naturales. Si se detecta un exceso de heterocigotos, esto puede indicar selección sobredominante o eventos estocásticos.

#### **2.3.4. Estructura genética**

La diversidad total de una especie consta de componentes intra e interpoblacional, se hace necesario analizar cómo se distribuye y se estructura la variabilidad genética global en y entre distintas poblaciones naturales (Sosa et al.2002). En este caso, podemos cuantificar y determinar el grado de diferenciación genética y la distribución de esta variación a nivel interpoblacional (Templeton, 2006).

Estudios realizados por Hamrick y Godt (1989) mencionan:

“La diversidad genética puede verse afectada de forma diferente por distintos procesos evolutivos y ecológicos o reproductivos de acuerdo con la actuación que estos tengan al nivel de las poblaciones o de la especie. No obstante, la partición del total de la diversidad genética de una especie en sus componentes intra e interpoblacional nos permite conocer su organización en el espacio” (p.15).

Es decir, la estructura genética intrapoblacional consiste en los diferentes tipos de alelos y sus frecuencias en dicha población. Existe una estructuración genética dentro de una población cuando las frecuencias alélicas no se distribuyen al azar, sino que siguen un determinado patrón o arquitectura que bien puede ser espacial o temporal. Por su parte, la estructura genética interpoblacional es el resultado de la distribución geográfica y en el espacio de subpoblaciones entre las cuales existen diferencias genéticas.

### **2.3.5. AMOVA**

El Análisis de varianza molecular es un procedimiento estadístico, cuyo modelo fue inspirado en el ANOVA. Permite la división jerárquica de la variación genética entre las poblaciones y regiones, así mismo, también permite estimar los estadísticos F y R.

Según Giménez-Pecci et al. (2006):

“El AMOVA es útil cuando se pretende estudiar la variabilidad de una respuesta (multivariada de datos binarios) y conocer la influencia de ciertos factores de clasificación (que generan categorizaciones en los datos) sobre esa respuesta” (p.143).

Entendiéndose, que la significancia de las componentes de varianza y de los estadísticos derivados se obtiene mediante pruebas de permutación para evitar los supuestos de normalidad usuales en el análisis de varianza clásico que podrían resultar inapropiados para datos moleculares.

El método se basa en el hecho de que una suma de cuadrados puede ser escrita como la sumatoria de las diferencias al cuadrado entre todos los pares de observaciones (Li, 1976). Se construye el análisis jerárquico de variación molecular directamente desde la matriz de distancias (al cuadrado) entre todos los pares de observaciones. Si bien el análisis fue propuesto usando la métrica Euclídea estándar, éste se podría utilizar con métricas de distancias alternativas.

### **2.3.6. Estadístico F**

Las poblaciones subdivididas se estudian según tres niveles de diferenciación genética: Dentro de cada subpoblación (I), entre subpoblaciones (S) y en la metapoblación o conjunto de las subpoblaciones (T) (Hartl 1981, Hartl y Clark 1989). La evaluación de esta subdivisión de poblaciones se estudia bajo los índices de fijación de Wright (FIS, FST y FIT) (Wright, 1951).

Según los métodos descrito por Weir y Cockerham (1984):

“F, coeficiente general de consanguinidad o índice de fijación en la metapoblación: corresponde a FIT de Wright y es un indicador de si dos alelos de



un mismo locus en un individuo son idénticos por descendencia respecto a la metapoblación” (p.66).

Al igual que  $f$  los valores varían entre -1 y 1, dependiendo de si existe exceso de heterocigotos o defecto, respecto al equilibrio Hardy-Weinberg. La reducción total de heterocigotos incluye por una parte los fenómenos de endogamia en las subpoblaciones (FIS) y los efectos de la propia subdivisión (FST) por otra.

### **2.3.7. Estadístico R**

Slatkin (1995) propuso una medida de diferenciación genética (RST), análoga al FST de Wright (1951) y GST de Nei (1973).

Según Slatkin (1995)

“El RST está basado en el SMS (Stepwise Mutation Model), el cual permite estimar las relaciones entre individuos y su estructura poblacional en ausencia de homoplasia (cuando dos alelos son idénticos por el estado, pero no por descendencia)” (p.68).

El modelo se basa en rasgos con distribución continua, número de pares o el número de repeticiones de base, y grupos de individuos de acuerdo con el número de repeticiones.

### **2.3.8. Delta K**

Para el cálculo de Delta K se requiere el análisis de un método de agrupamiento sistemático Bayesiano, denominado STRUCUTRE; el cual se basa en la estimación de cadenas de Monte Carlo y Markov (MCMC).

Porras-Hurtado et al. (2013) afirma:

“STRUCTURE calcula la probabilidad posterior de la data en un rango de K clusters al estimar la probabilidad posterior de K, denominada X (denominada:  $X|K$ ). Al especificar un rango de posibles valores de K para obtener los valores “X”, el valor de la probabilidad posterior se convierte cada vez más pequeña en cada simulación” (p.16).

Es decir, en cada simulación, el cálculo de la probabilidad posterior genera un coeficiente de membresía el cual es asignado para cada individuo en cada grupo. Las cadenas MCMC mencionadas anteriormente se basan en la asignación de individuos a un número predeterminado de grupos o clusters de manera aleatoria. Luego, las frecuencias alélicas variantes son estimadas en cada grupo y los individuos son nuevamente asignados de acuerdo a este nuevo cálculo de las frecuencias alélicas.

### **2.3.9. Teoría Ecológica del parchado**

El indicador de población está en función de la Teoría Ecológica. Dentro de la Teoría Ecológica, está la Teoría del parchado.

Según Okubo (1975):

“La Teoría del parchado presenta tres categorías: Aleatorio, uniforme y conglomerado; donde los organismos se agregan en función de su reproducción, alimento, defensa, etc.” (p. 30).

Cuando los organismos se agregan de manera aleatoria, un individuo tiene igual de probabilidad de agregarse en cualquier parte de un área, donde ocurren procesos de interacción neutra entre los individuos, y entre los individuos y el medioambiente. La categoría uniforme explica que los individuos se encuentran en espacio uniformes y existe interacciones antagonistas entre los individuos o el agotamiento local de recursos, y finalmente la categoría de conglomerado en donde los individuos viven en áreas de alta abundancia, los cuales son separadas por áreas de baja abundancia, así mismo la atracción entre los individuos o atracción de individuos para un mismo recurso.

### **2.3.10. Teoría sobre los ecosistemas**

Según Jorgensen (2004):

Todos los ecosistemas son sistemas abiertos embebidos en un entorno del que reciben energía-materia (input) y descargan energía-materia (output). Desde un punto de vista termodinámico este es un prerequisite para los procesos ecológicos. Si los ecosistemas estuviesen aislados, sin limitar con una fuente de energía de baja entropía y un sumidero de energía de alta entropía, se aproximarían al equilibrio termodinámico sin vida y sin gradientes. Además, no existen organismos aislados sino conectados con otros, la unidad

mínima teórica para cualquier ecosistema son dos poblaciones, una de las cuales fija energía y la otra descompone y recicla los residuos, pero en la realidad los ecosistemas viables son redes complejas de poblaciones que interactúan entre sí.

## **2.4. Definición de términos básicos**

### **2.4.1. Descripción botánica de *Puya raimondii* Harms**

*Puya raimondii* es una planta monocárpica que pertenece a la familia Bromeliaceae, endémica de los Andes Centrales. El tamaño de la inflorescencia alcanza a 9,5 m de alto, pero puede llegar a 14 m. Tallo erguido simple de 4 a 6m de alto, 0,6 m de diámetro.

Hojas dispuestas en roseta alrededor del tallo, el cual se levanta a medida que crece; limbo lanceolado, coriáceo, de 1 a 1,25 m de longitud y de 15 a 20 cm de ancho, subglabro, cara adaxial y abaxial cubierta con tricomas compuestos (Smith y Downs 1974, Morales y Suni, 2003), bordes provistos de garfios (espinas), coriáceos, 1cm de largo dirigidos en todas direcciones; vaina carnosa, blanca, de 20 a 25 cm de ancho y 15 cm de largo.

### **2.4.2. Población**

Conjunto de organismos de la misma especie que ocupan un área más o menos definida y que comparten determinado tipo de alimentos. Aunque cada especie suele tener una o más poblaciones distribuidas cada una en un área predeterminada, no existe ningún impedimento para que dos poblaciones de una misma especie se fusionen ni tampoco para que una población se divida en dos.

### **2.4.3. Marcadores moleculares microsatélites (SSR)**

Marcador molecular basado en simple secuencia repetida que considera el número de alelos, combinaciones respectivas, calidad de lectura, contenido de información polimórfica (PCI). Cada secuencia SSR se define por el tipo de unidad repetida (generalmente compuesta de di, tri, tetra, etc.) y por el sitio que ocupan en el genoma (locus). La variabilidad en el número de unidades repetidas es típicamente la base para

observar el polimorfismo, la mayoría de los marcadores SSR son generalmente codominantes.

#### **2.4.4. Variabilidad genética**

La variabilidad genética de una población está asociada con la viabilidad de la población a largo plazo. En tiempo evolutivo, una población con poca variabilidad genética en rasgos de importancia ecológica (i.e. caracteres que afectan el éxito de los individuos o su interacción con el ambiente) tendrá menos posibilidades de responder a cambios ambientales futuros y su probabilidad de extinción sería más alta (López-Gallego, 2015).

La estimación de la variabilidad genética de una población requiere de una muestra representativa de individuos en términos de los rasgos genéticos de interés. Con esta muestra se pueden usar métodos de genética de poblaciones o de genética cuantitativa para estimar la variabilidad en los rasgos.

#### **2.4.5. Diversidad genética**

Las diferencias heredables constituyen la materia prima sobre la que actúan las fuerzas evolutivas y moldean la variada complejidad de los seres vivos. El resto de la biodiversidad se deriva de los procesos evolutivos que operan sobre esas variaciones.

Fisher (1930) afirma:

“La Tasa con que incrementa la eficacia biológica de la población en un momento dado es igual a su variabilidad genética respecto a la eficacia biológica en ese momento” (p. 136).

#### **2.4.6. Estructura genética**

Una población puede ser considerada como una unidad, pero ante determinadas circunstancias se pueden subdividir o estructurar en varias de menor tamaño. En tal caso, la relación entre cada subpoblación puede variar según el grado de flujo génico que exista. Para que una población se considere estructurada se debe detectar fuertes diferencias en las frecuencias alélicas entre las poblaciones, debido a la ausencia de flujo génico. Por otro lado, una baja estructura genética indica poblaciones casi idénticas, con nulas o muy pocas diferencias en las frecuencias alélicas, de esta forma, el flujo génico actúa como

una fuerza evolutiva cohesiva que evita que cada una de las poblaciones sean demasiado diferentes (Slatkin, 1994; Eguiarte, 2010).

#### **2.4.7. Heterocigosidad**

Heterocigosidad (H) representa una mejor medida de la variación genética, ya que es precisa y no arbitraria. Estudiada como HO y HE, se define como HO la frecuencia relativa de individuos heterocigotos observados en la muestra para cualquiera de los loci y la heterocigosidad Esperada (HE).

Nei (1987) afirma:

“El promedio de Heterocigosidad o diversidad genética es el método de medición más adecuado de la variación genética, pues no depende de la arbitrariedad de la definición de polimorfismo y puede ser definida sin ambigüedad en términos de frecuencias alélicas” (p.14).

Por lo que existe un consenso entre los genetistas poblacionales sobre la correlación positiva existente entre la heterocigosidad, o una alta variación genética entre las poblaciones, y el fitness que en términos evolutivos es una medida de la capacidad de una población o individuo para responder a las presiones de la selección natural; puede encontrarse como la contribución esperada de un alelos, fenotipo o genotipo a las siguientes generaciones (Stearns 1992); y, en términos ecológicos, suele presentarse referenciado a la competencia dentro de una comunidad que nos va a determinar la supervivencia (Morris 1992).

#### **2.4.8. Índice de contenido polimórfico**

El Índice de Contenido Polimórfico (PIC) es similar al valor de heterocigosidad y oscila entre 0 y 1. Este índice evalúa la información de un marcador en la población de acuerdo a las frecuencias de los alelos. De acuerdo a Nei y Kumar (2000): “El polimorfismo genético se genera principalmente debido a mutaciones puntuales, inserciones, deleciones, conversión génica y recombinación intralélica” (p.12). En base a la afirmación, varios autores coinciden en que es necesario el uso de un criterio arbitrario a fin de precisar el polimorfismo de un locus de acuerdo a su frecuencia alélica; ya que,

cuando se aumenta en número de individuos muestreados en una población, la probabilidad de encontrar un nuevo alelo también aumenta.

#### **2.4.9. AMOVA**

El Analysis of Molecular Variance es un procedimiento estadístico, cuyo modelo fue inspirado en el ANOVA. Permite la división jerárquica de la variación genética entre las poblaciones y regiones, así mismo, también permite estimar los estadísticos F y R. Se basa en una matriz de distancias genéticas entre las muestras para medir y comparar la estructura genética de las poblaciones y considera como hipótesis nula ( $H_0$ ) que las subpoblaciones pueden ser entendidas como parte de una única población genética. Además, el AMOVA es una prueba estadística por permutación aleatoria.

#### **2.4.10. Estadístico F**

El coeficiente de endogamia (FIS) es la probabilidad de que dos alelos en un individuo sean idénticos por descendencia respecto a la subpoblación, es decir, mide la desviación de las frecuencias genotípicas respecto a las frecuencias panmícticas, en términos de exceso o deficiencia de heterocigotos. Esto probablemente causado por cruzamientos entre individuos emparentados. El rango de su valor oscila entre -1 y 1, donde el exceso de heterocigotos (EHW) es representado por los valores negativos y la deficiencia de ellos por valores positivos.

#### **2.4.11. Estadístico R**

RST está basado en el SMS (Stepwise Mutation Model), el cual permite estimar las relaciones entre individuos y su estructura poblacional en ausencia de homoplasia (cuando dos alelos son idénticos por el estado, pero no por descendencia) (Slatkin, 1994). El modelo se basa en rasgos con distribución continua, número de pares o el número de repeticiones de base, y grupos de individuos de acuerdo con el número de repeticiones.

#### **2.4.12. Delta K**

Se trata de un método de agrupación bayesiana que ayuda a inferir la estructuración poblacional. Este método asigna los individuos (probabilísticamente) a K grupos

(agrupamientos-K), sin la necesidad de conocer a priori los límites poblacionales y reduciendo al mínimo las desviaciones del EHW. El enfoque utiliza las frecuencias alélicas en cada locus para estimar los grupos genéticamente distintos (K) y es por eso que se puede asumir cierto grado de flujo génico entre los grupos. El programa también utiliza MCMC con la finalidad de que suficientes iteraciones se ejecuten para obtener muestras aproximadas de una distribución de probabilidad cuando esta no puede ser simulada directamente.

## **2.6. Hipótesis:**

### **2.6.1. General**

- El rango de distribución de *Puya raimondii* está estructurado en dos poblaciones genéticas que se corresponden con los morfotipos reportados en el Norte y Sur de los Andes de Perú.

### **2.6.2. Específicas**

#### HE N° 1

- La estructura genética presenta correspondencia con los morfotipos de *Puya raimondii* en el Norte y Sur de los Andes de Perú.

#### HE N° 2

- Las poblaciones de *Puya raimondii* para las localidades de Choconchaca (Puno), Pachapaqui (Ancash) y Yanacancha (Junín) presentan diferenciación genética.

#### HE N° 3

- La localidad que presente una alta diversidad genética y diferente estructura genética sería considerado una futura área de conservación regional de *Puya raimondii* en el Perú.

## 2.7. Variables: Dimensiones e indicadores

**Tabla N° 1.** Variables (definición y operacionalización de variables: Dimensiones e indicadores)

Variables	Definición conceptual	Dimensiones	Indicadores	Instrumento	Ítem
<b>Variable independiente</b>  <i>X: Puya raimondii</i>	Nombre científico de una especie vegetal, endémica de la zona alto andina de Bolivia y Perú habita entre los 3200 a 4800 msnm, con distribución desde el Norte hasta el Sur del Perú.	Taxonómico Ecológico Genético Geográficos	X <sub>1</sub> : Población	Censo Teledetección Molecular	Teledetección Molecular
			X <sub>2</sub> : Latitud	GPS	GPS
			X <sub>3</sub> : Longitud	GPS	GPS
			X <sub>4</sub> : Tamaño	Cinta métrica	Cinta métrica
<b>Variable dependiente 1</b>  Y:Diversidad genética	Variaciones heredables que ocurren en cada organismo, entre los individuos de una población y entre las poblaciones dentro de una especie. Es el resultado de las diferencias que existen entre las distintas versiones (alelos) de las unidades de herencia (genes) de los individuos de una especie.	Biológicos Genéticos Moleculares	Y <sub>1</sub> : N° de alelos en un locus (A)	Programas: Cervus GenAIEX	Programa Cervus
			Y <sub>2</sub> : Heterocigosidad	Programa GenAIEX	Programa GenAIEX
			Y <sub>3</sub> : Índice de contenido polimórfico (PCI)	Programa Cervus	Programa Cervus
			Y <sub>4</sub> : Prueba de equilibrio Hardy-Weinberg (EHW)	Programas: Genepop GenAIEX	Genepop
<b>Variable dependiente 2</b>  Z:Estructura genética	La estructura genética se debe a las fuertes diferencias en las frecuencias alélicas entre las poblaciones, debido a la ausencia de flujo génico. Por otro lado, una baja estructura genética indica poblaciones casi idénticas, con nulas o muy pocas diferencias en las frecuencias alélicas, de esta forma, el flujo génico actúa como una fuerza evolutiva cohesiva que evita que cada una de las poblaciones sea demasiado diferentes.	Genéticos Moleculares Estadísticos	Z <sub>1</sub> = Amova	Programas: GenAIEX Arlequin	Programas: GenAIEX Arlequin
			Z <sub>2</sub> = Estadístico F	Programa GenAIEX	Programa GenAIEX
			Z <sub>3</sub> = Estadístico R	Programa GenAIEX	Programa GenAIEX
			Z <sub>4</sub> = Delta K	Programas: Structure Genetix	Programas: Structure Genetix



## CAPÍTULO III: MARCO METODOLÓGICO

### 3.1. Tipo, método y diseño de la investigación

El tipo de investigación es aplicada, con método descriptivo comparativo y usando un diseño experimental con datos cuantitativos. El estudio de investigación es parte de un proyecto más grande que lleva por título: “Variabilidad genética y foliar de las poblaciones de *Puya raimondii* Harms”, producto del Convenio entre South China Botanical Garden de la Academia de Ciencias de China y la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos; a cargo del Doctor Xue- Jun Ge y la M.Sc. Mery Luz Suni Ninataype, también contó con la participación de investigadores descritos en el Anexo N°6.1.

Además, previamente a las colectas en las áreas de estudio, se realizaron trámites para solicitar permisos de colecta al Servicio Nacional Forestal y de Fauna Silvestre (SERFOR), emitiéndose tres permisos de colecta para las poblaciones de Pachapaqui (Ancash), Yanacancha/Sector Cachi y Sector Huáscar (Junín) y Choconchaca (Puno) con número de autorización N° 282 – 2017 – SERFOR / DGGSPFFS, N° 140 – 2017 – SERFOR / DGGSPFFS y N° 043 -2018 – SERFOR / DGGSPFFS respectivamente.

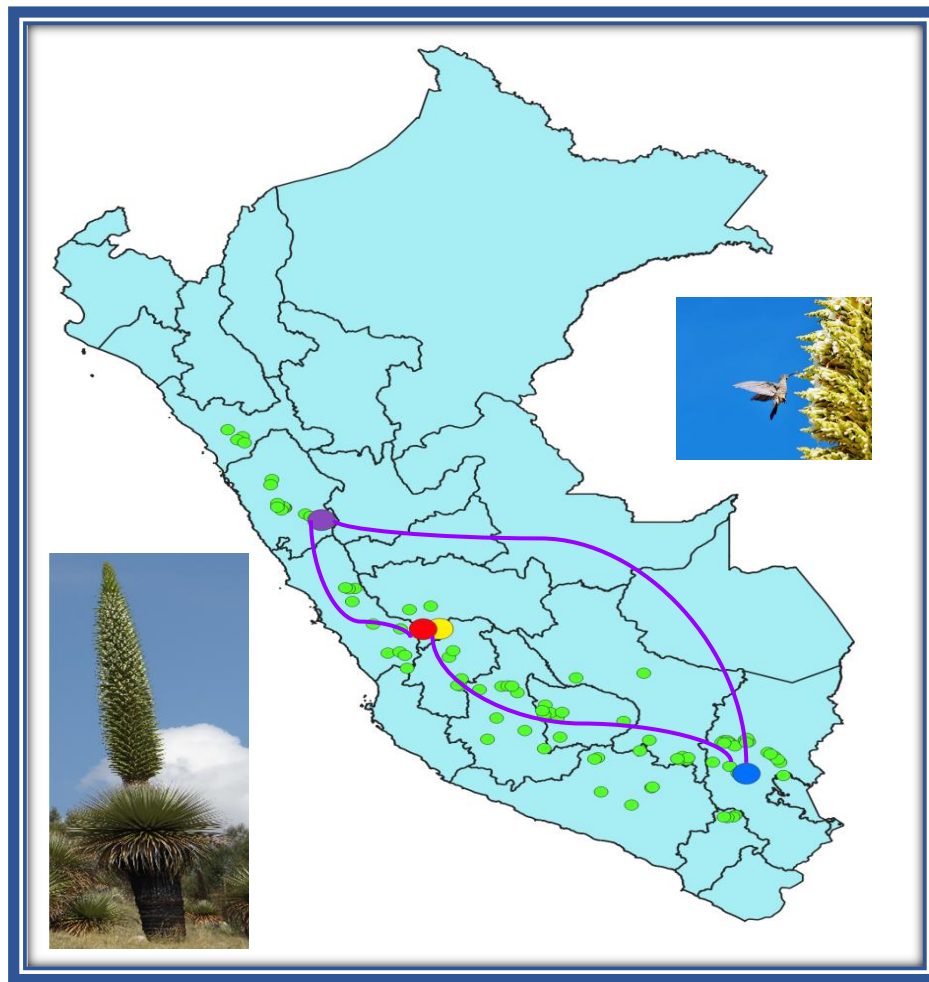
### 3.2. Población y muestra (escenario de estudio)

El estudio evaluó tres poblaciones de *Puya raimondii*, la primera población donde se hizo el muestreo fue Pachapaqui, ubicada en el departamento de Ancash, provincia de Bolognesi, distrito de Aquia; para la segunda población se evaluó al sector Huáscar y sector Cachi, ambas ubicados en el departamento de Junín, provincia de Chupaca, distrito de Yanacancha; finalmente la población de Choconchaca, ubicada en el departamento de Puno, provincia de Lampa, distrito de Lampa; tal como se observa y describe en la Figura N ° 1 y Tabla N °2 respectivamente .

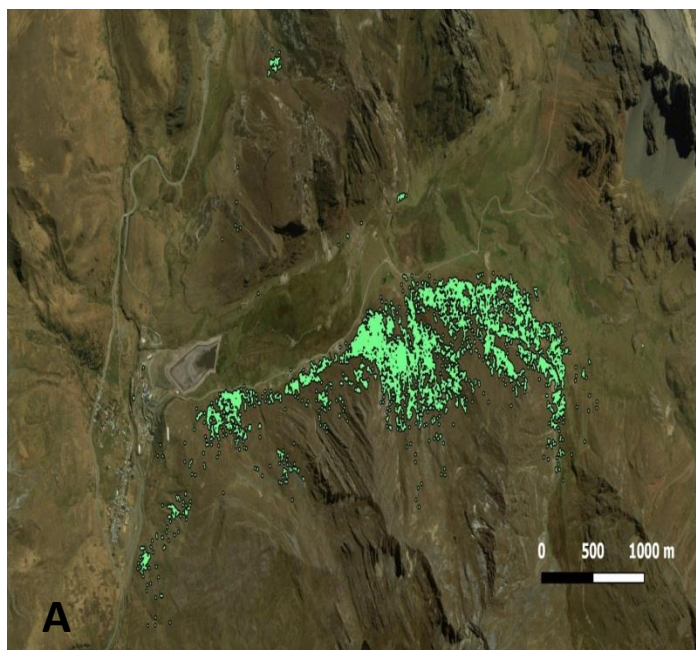
**Tabla N° 2.** Ubicación de las localidades de *Puya raimondii*

Departamento	Provincia	Distrito	Población	Latitud	Longitud	Altitud (msnm)
Ancash*	Bolognesi	Aquia	Pacahapaqui	77.088 W	9.958S	3800
Junín	Chupaca	Yanacancha	Yanacancha / Sector Huáscar	75.440 W	12.236 S	4170
Junín	Chupaca	Yanacancha	Yanacancha / Sector Cachi	75.475 W	12.247 S	4124
Puno	Lampa	Lampa	Choconchaca	70.088 W	15.258 S	3962

\*Especie usada para "genome skimming"

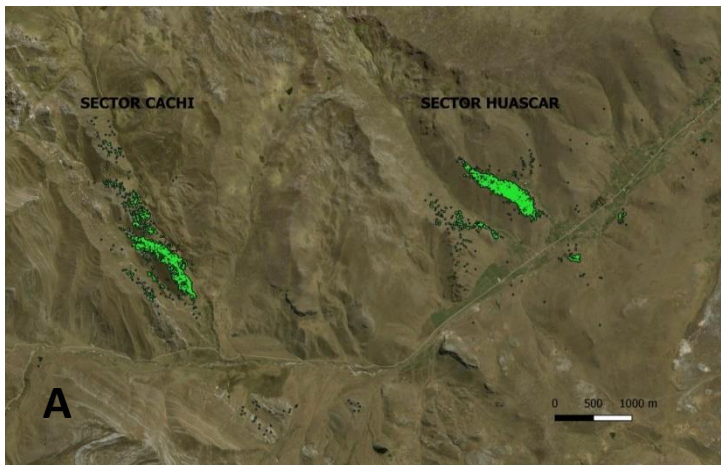


**Figura N° 1.** Mapa geográfico de la distribución de *Puya raimondii* en el Perú. Los puntos verdes corresponden a los lugares donde se encuentra la especie, mediante Teledetección – Google Earth (G. Prado, 2019). El círculo azul, corresponde a la población de Choconchaca; círculo rojo y amarillo corresponden al sector Cachi y Huáscar respectivamente; finalmente el círculo purpura corresponde a la población de Pachapaqui.

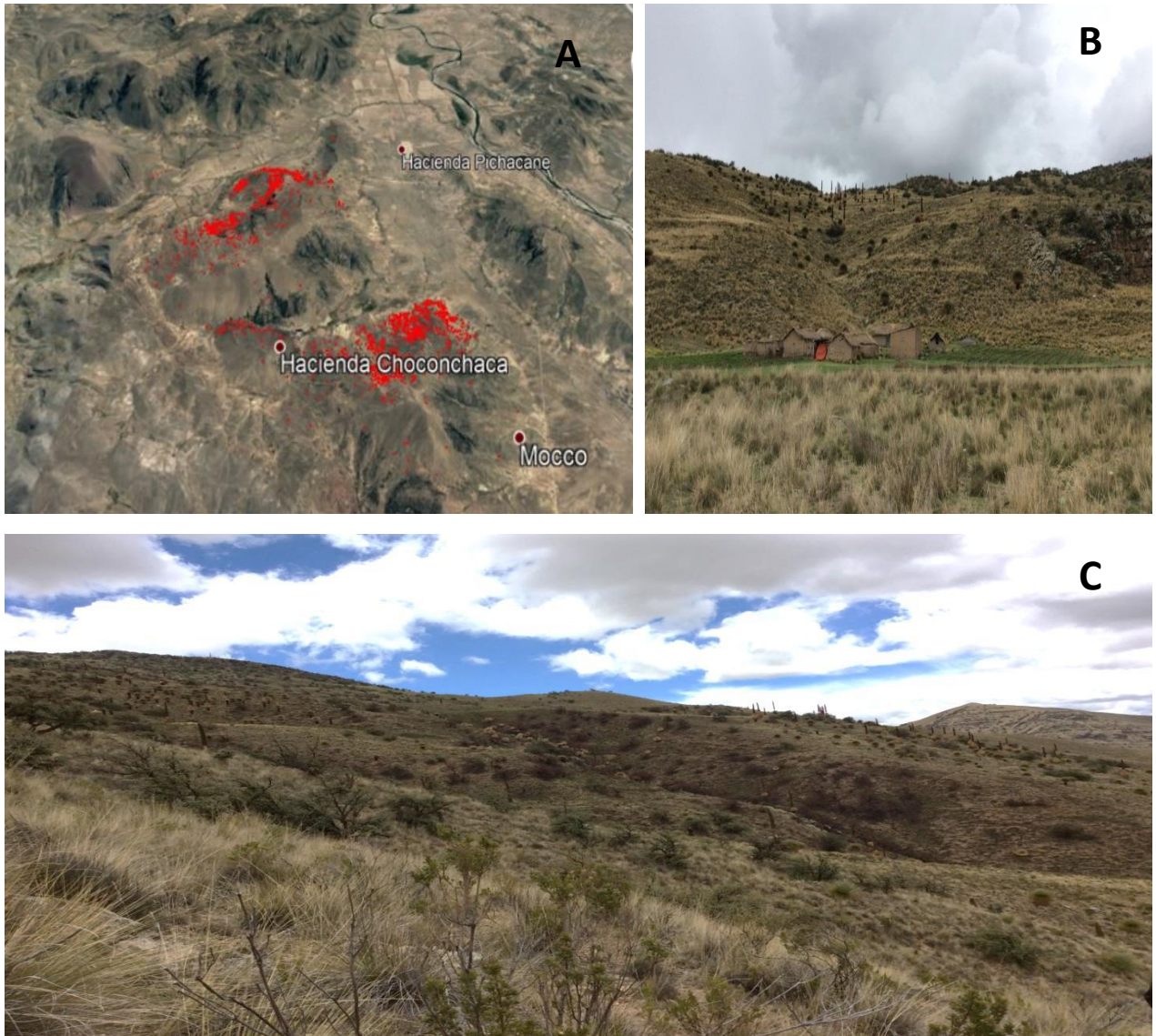




**Figura N° 2.** A: Vista de Google Earth – escala 1:60000, área de color verde representa la distribución de *Puya raimondii* en la población de Pachapaqui, Aquia, Ancash; B: Individuos adultos y juveniles de *Puya raimondii* próxima a una carretera; C: Vista lateral de una parte de la población de Pachapaqui, Ancash.



**Figura N° 3.** A: Vista de Google Earth – escala 1:60000, las áreas verdes representan los sectores de Cachi y Huáscar, Yanacancha, Junín; B: Vista lateral de una sección del sector Huáscar, población Yanacancha, Junín; C: Vista frontal de una sección del sector Cachi, población Yanacancha, Junín.



**Figura N° 4.** A: Vista de Google Earth – escala 1:60000, las áreas rojas representan los sectores de la distribución de *Puya raimondii* en la población de Choconchaca, Lampa, Puno; B: Vista frontal de una sección de la población de Choconchaca, Lampa, Puno; C: Vista lateral de una sección de la población de Choconchaca, Lampa, Puno, acompañada de árboles de Queñual.

### 3.2.1. Colecta de las muestras

La primera colecta de muestras foliares se realizó con el propósito de diseñar marcadores microsátélites específicos para *Puya raimondii*, para ello se colectó muestras foliares de las especies: *Puya macropoda*, *Puya hutchinsonii* y *Puya macrura*, ésta última se encuentra estrechamente relacionado con *P. raimondii* (Jabaily y Sytsma 2010). *P. hutchinsonii* se recolectó en la provincia de Huaylas, departamento de Ancash, *P. macrura* fue recolectada en los alrededores de la Laguna de

Puruhuay en la provincia de Huari, departamento de Ancash; y *P. macropoda* fue colectado en la provincia de Yungay, departamento de Ancash, tal como se describe en la Tabla N°3.

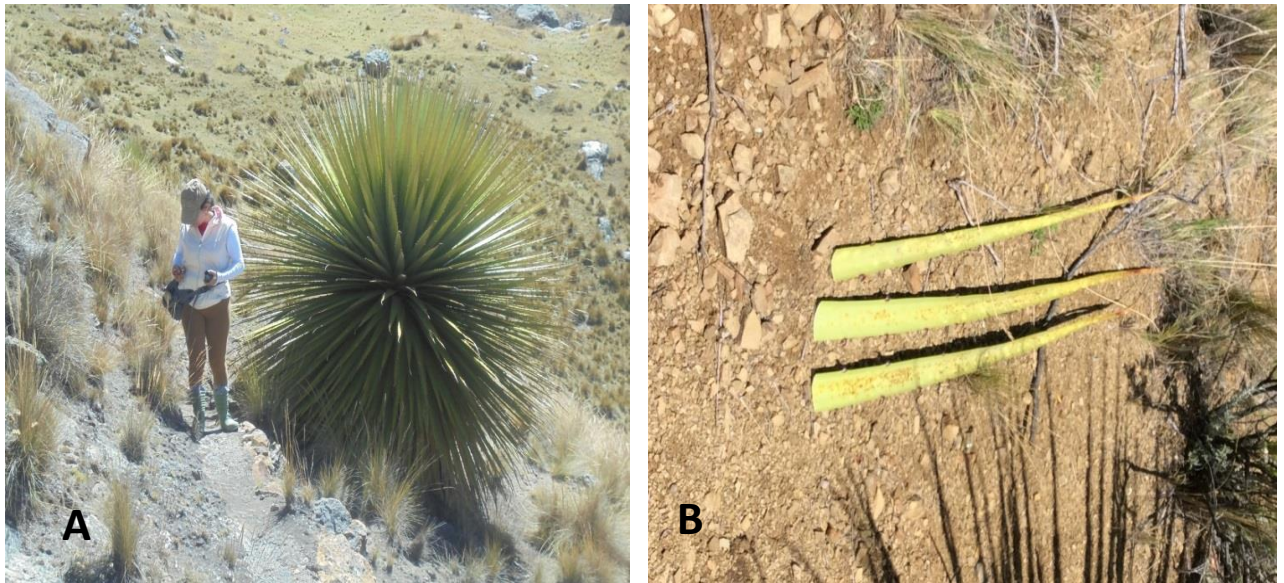
**Tabla N° 3.** Ubicación geográfica de las especies para el diseño de marcadores microsatélites para *Puya raimondii*

Especie	Distrito	Departamento	Latitud	Longitud	Altitud (msnm)
<i>Puya hutchisonii</i> *	Huaylas	Ancash	77.811 W	9.046S	4250
<i>Puya macrura</i>	Huari	Ancash	77.64 W	9.07S	3850
<i>Puya macropoda</i> *	Yungay	Ancash	77.183 W	9.319S	3450

\*Especie usada para "genome skimming"

La segunda colecta de las muestras se realizó para probar el uso práctico de los marcadores microsatélites o SRR específicos de *Puya raimondii* en la diversidad genética de las localidades del estudio, descritas en la Tabla N°2. Para la extracción de muestras foliares, se muestrearon 28 individuos de la población de Pacahapaqui, 15 individuos sector Cachi, 14 individuos del sector Huascar; ambos para la población de Yanacancha; y finalmente 27 individuos de la población de Choconchaca, descritos geográficamente en el Anexo N°6.2. La elección de cada individuo de *Puya raimondii*, fue lo más representativo a la localidad de estudio; por lo que se consideraron los individuos en parches distantes. Los individuos se seleccionaron en base al tamaño y la distancia, se seleccionaron individuos de un tamaño promedio de 1.50 m (estadio juvenil), y a una distancia mínima de separación de 10m entre individuos. A los individuos seleccionados, se realizaron mediciones de altura, utilizando una cinta métrica, también se midieron las coordenadas geográficas, utilizando un GPS, tal como se observa en la Figura N°5.

Posteriormente se extrajeron muestras foliares con una tijera de podar y guantes gruesos para evitar cualquier tipo de daño que pudieran ocasionar las espinas de las hojas de *Puya raimondii* (Figura N°5). Se seleccionaron las hojas más próximas al centro de la planta; ya que son hojas más tiernas o jóvenes que permitieron facilitar el proceso de corte, de la muestra foliar se cortaron fragmentos foliares de 4cm x 5cm aproximadamente sin incluir nervaduras y que no presenten daño mecánico, ni esté afectado por insectos, hongos o virus. Los fragmentos foliares fueron depositados en una bolsa plástica resellable (bolsa ziploc) con su respectiva codificación: finalmente se añadió silica gel a las bolsas ziploc en una proporción de 10 veces más silica gel que muestra, se verificó constantemente que la silica gel permanezca seco y sin hongos para almacenarlas en una caja tecnopor con el fin de trasladar el material al Laboratorio de Fisiología Vegetal.



**Figura N° 5.** A: Registro de coordenadas geográficas a un individuo de *Puya raimondii*, B: Muestras foliares

Las fracciones foliares colectadas tuvieron como destino el Laboratorio de Fisiología Vegetal, Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, lugar dónde fueron divididos en tres partes para cada una de las localidades evaluadas; es decir, se obtuvieron tres replicas, la primera replica fue para exportar al Laboratorio de Ecología Molecular, South China Botanical Garden de la Academia de Ciencias de China, la segunda replica para el herbario del Museo de Historia Natural y la tercera replica se quedó en el Laboratorio de Fisiología Vegetal. Además del material colectado para las evaluaciones moleculares, se colectó muestras botánicas con tres vouchers por cada población para depositarlas al herbario del Museo de Historia Natural tanto para la primera y segunda colecta; con número de registro descritas en la Tabla N°4.

**Tabla N° 4.** Número de vouchers de las especies depositadas en el Museo de Historia Natural

Espece	Localidad	Vouchers - Herbario
<i>Puya raimondii</i>	Pachapaqui, Aquia, Bolognesi, Ancash	M. Suni et al. s.n. (USM-315307)
<i>Puya raimondii</i>	Huáscar, Yanacancha, Chupaca, Junín	G. Prado et al. s.n. (USM-315311)
<i>Puya raimondii</i>	Cachi, Yanacancha, Chupaca, Junín	G. Prado et al. s.n. (USM-315310)
<i>Puya raimondii</i>	Choconchaca, Lampa, Puno	L. Tumi et al. s.n. (USM-315308)
<i>Puya hutchisonii</i>	Huaylas, Ancash	Xue-Jun Ge et al. 221 (USM)
<i>Puya macrura</i>	Huari, Ancash	Xue-Jun Ge et al. 165 (USM)
<i>Puya macropoda</i>	Yungay, Ancash	Xue-Jun Ge et al. 32 (USM)

### 3.3. Técnicas e instrumentos de recolección de datos

#### 3.3.1. Desarrollo de marcadores SSR

Las muestras de ADN extraído de *P. raimondii*, *P. macrura* y *P. hutchinsonii* se colocaron en el Instituto de Genómica de Beijing (BGI)(Shenzhen, China) para construir una biblioteca de DNA ("DNA library"). La biblioteca fue secuenciada usando la plataforma "Illumina HiSeq 2500/4000 De Novo Sequencing". Las lecturas de la biblioteca fueron ensambladas por el programa de SPAdes 3.13.0 (<http://cab.spbu.ru/files/release3.13.0/manual.html>). Las secuencias ensambladas fueron abiertas y verificadas por el programa Geneious 11.0 (<http://geneious.com>).

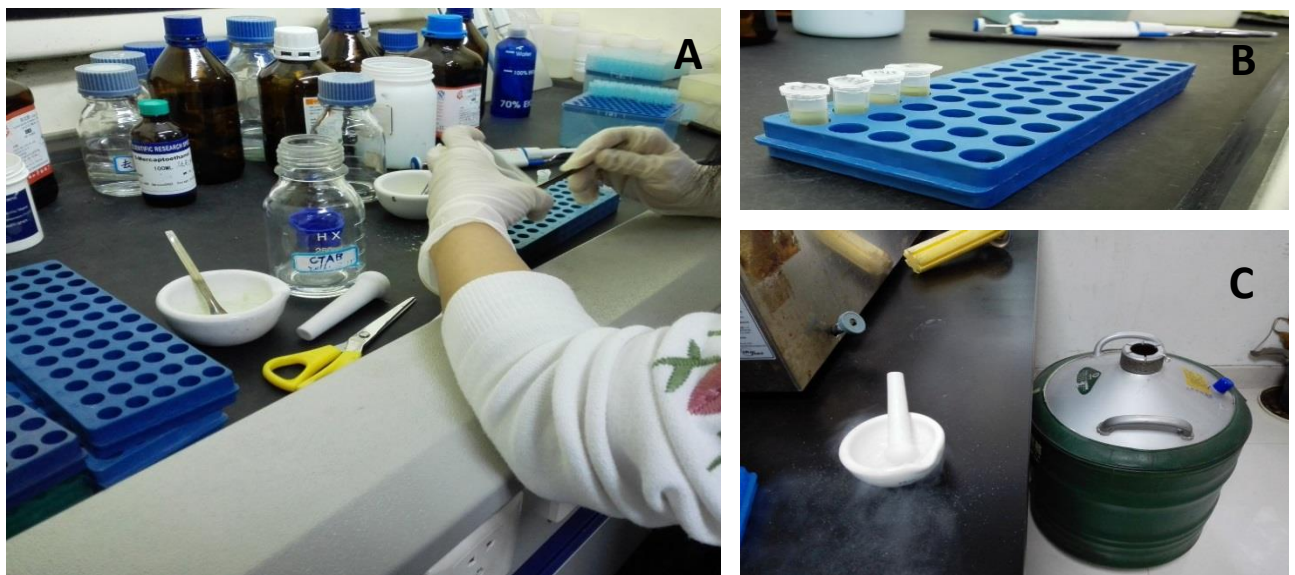
Para la búsqueda de los marcadores SSR y diseño de los cebadores SSR ("primers"), se usaron los resultados de las secuencias ensambladas de *P. raimondii*, se seleccionaron los marcadores SSR o microsatélites usando el programa SciRoKo versión 3.4 (<http://kofler.or.at/bioinformatics/SciRoKo/index.html>). Para la identificación de los marcadores SSR, se adoptó un criterio de longitud mínima de 15 bases. Los pares de primers de PCR que flanquean las repeticiones de los marcadores SSR, se diseñaron utilizando el programa Primer3web versión 4.1.0 (<http://primer3.ut.ee/>) con los parámetros predeterminados. El objetivo de la secuencia del fragmento con el marcador SSR fue determinado de acuerdo al fragmento del primer y comparado con las secuencias ensambladas de *P. macrura* y *P. hutchinsonii* mediante el programa BioEdit v7.0.9.0 (Hall, 2011).

#### 3.3.2. Extracción de ADN genómico

La extracción del ADN genómico se realizó con el método CTAB (Doyle & Doyle, 1989) en el Laboratorio de Ecología Molecular del South China Botanical Garden de la Academia de Ciencias de China, se seleccionaron muestras en buenas condiciones (limpias y sin daño de patógenos); y se prepararon tubos con 1mL de CTBA (Figura N°6). Las muestras seleccionadas fueron trituradas "fuertemente", usando una pequeña cantidad de quartz washed and calcined SiO<sub>2</sub> 60.8, nitrógeno líquido y un mortero; la muestra resultante (polvo) fue transferida a los tubos con CTBA previamente preparados, éste proceso se realizó de manera rápida para evitar la degradación de ADN; posteriormente se agitaron los tubos manualmente para introducirlos a baño María (65°C) durante 1 hora; al término se colocaron 800µL cloroformo a los tubos, realizando una mezcla manual por 5 minutos; luego se centrifugaron los tubos por 10 minutos a 1200 RPM. Al término de la centrifugación, se extrajo el sobrenadante a nuevos tubos y se añadió a cada tubo 800µL de cloroformo más Isopropil, se volvió a centrifugar a las mismas condiciones; posteriormente se extrajo todo el sobrenadante a tubos de 1.5mL para añadirles 500µL de Isopropil. Las muestras resultantes,

se colocaron en refrigeración durante 4 horas, después se centrifugó por 10 minutos a 1200 RPM y 23°C.

Finalmente se hicieron 4 lavadas, las dos primeras con una solución de alcohol de 75% y las dos últimas con alcohol al 100%, al término de cada lavado se centrifugaron los tubos a 1200 RPM por un tiempo de 6 minutos y 3 minutos respectivamente; posteriormente se dejaron los tubos abiertos por una hora, a las muestras resultantes se colocaron 50µL de agua refrigerada con el propósito de disolver el ADN y fueron codificados para cada individuo de la población en estudio.



**Figura N° 6.** A: Proceso de extracción de ADN, B: Muestras trituradas con CTBA, C: Nitrógeno líquido para trituración de los fragmentos foliares.

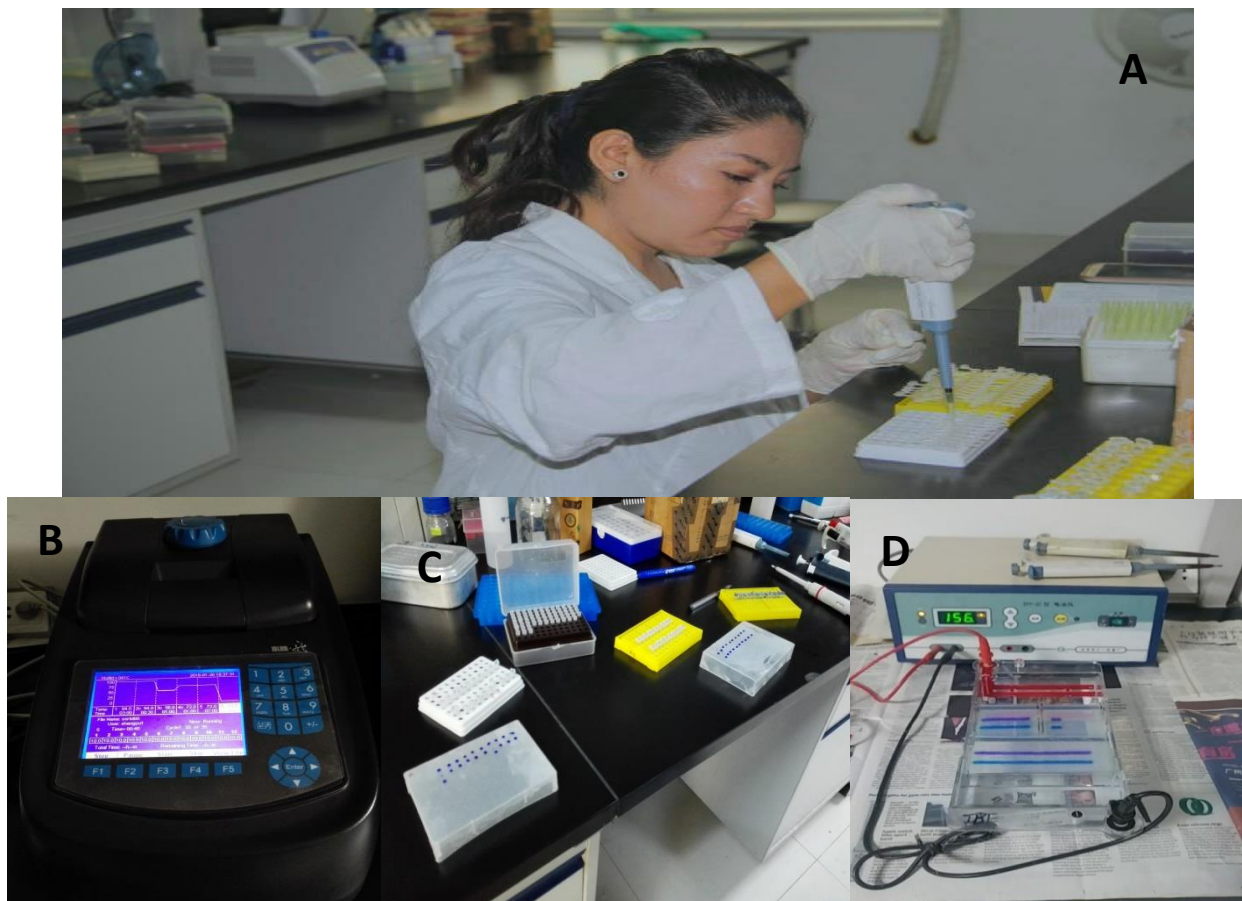
Para verificar la calidad de ADN, se preparó un gel en la proporción 1:1 de agarosa al 1% (Biowest Regular Origin Spain) y TBE, luego se colocó la mezcla en la microonda por cuatro minutos, se dejó enfriar hasta que la solución estuviera tibio para añadirle una pequeña cantidad de EB; la muestra resultante se dejó solidificar. Por otro lado, con ayuda de una micropipeta se mezclaron 3µL de buffer y 3µL de DNA para introducir a cada rejilla del gel solidificado dentro de la cámara electroforética, finalmente se prendió la cámara electroforética para que corra por media hora, al término se tomaron fotografías de la calidad de la ADN, tal como se muestra en la Figura N°8.

### 3.3.3. Amplificación de los marcadores Microsatélites

La amplificación se realizó por PCR, previamente se preparó el ADN extraído para cada individuo de las localidades en estudio, para ello se usaron tubos 1.5 mL de capacidad, dónde se colocaron 495



$\mu\text{L}$  de agua de forma inclinada y  $5 \mu\text{L}$  de DNA, todo ello se mezcló. Posteriormente, se preparó el mix para el PCR, se usaron  $1 \mu\text{L}$  de Buffer II ( $\text{Mg}^{+2}$  + plus, Lote # A8701A-Store at-20C Takara),  $0.8 \mu\text{L}$  de dNTP Mix (Lote # BK7901A-Store at-20 Takara),  $0.06 \mu\text{L}$  de Taq enzyme,  $0.25 \mu\text{L}$  de Pri R,  $0.25 \mu\text{L}$  de Pri F,  $1 \mu\text{L}$  de DNA y  $6.64 \mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$ ; la proporción de cada uno fue multiplicado por la cantidad de muestras trabajadas para una corrida. Después de obtener el mix se colocó en otros tubos  $9.5 \mu\text{L}$  de la mezcla descrita más  $1 \mu\text{L}$  del Primer, se elaboró un programa de amplificación, las condiciones en el termociclador fueron: Primero una fase de desnaturalización inicial a  $94^\circ\text{C}$  por 3 minutos, segunda fase de desnaturalización de  $94^\circ\text{C}$  por 40 segundos, tercera fase de hibridación del cebador a  $60^\circ\text{C}$  por 1 minuto; cuarta fase a  $72^\circ\text{C}$  por 1 minuto y finalmente la fase extensión del DNA a  $72^\circ\text{C}$  por 5 minutos, con un total de 35 ciclos. Al término, se preparó gel de agarosa al 2%, es decir  $0.900$  de agarosa más  $45 \text{ mL}$  TBE y  $4 \mu\text{L}$  de EB; la muestra resultante se dejó solidificar. Luego con ayuda de una micropipeta se mezclaron  $1 \mu\text{L}$  de buffer más  $5 \mu\text{L}$  de los tubos resultantes de la PCR para introducir a cada rejilla del gel solidificado dentro de la cámara electroforética, también se colocó  $2 \mu\text{L}$  de DNA marker (DL 2,000 DNA Marker) a otra rejilla vacía; finalmente se prendió la cámara electroforética para que corra por media hora a  $160\text{V}$ , tal como se muestra en la Figura N°7.



**Figura N° 7.** A: Proceso de amplificación por PCR, B: Termociclador, C: Preparación de muestras para la electroforesis, D: Cámara electroforética.

Para verificar la diversidad de los marcadores Microsatélites (SSR), se realizaron reacciones de PCR con tres cebadores o primers, el primero cebador directo de secuencia específica con una cola M13 (-21) en su extremo 5', el segundo cebador inverso de secuencia específica y el tercero un cebador universal M13 (-21) marcado con fluorescencia o fluoróforos denominados: FAM, ROX, HEX y TAMRA; obtenidos de Invitrogen, Guangzhou, Guangdong, China)(Yuan, Zeng, Shi, & Zhang, 2017).

Para la amplificación de los SSR se usó el Primer Takara STAR HS DNA polimerasa (Takara BIO INC), con una mezcla que incluía 2  $\mu$ L de 5X Primer, 0.08  $\mu$ L de dNTP, 0.1 $\mu$ L de Primer Start, 1 $\mu$ L de Primer, 1 $\mu$ L de X-M13 (FAM, ROX, HEX, TAMRA), 1 $\mu$ L de DNA y 4.2 $\mu$ L de H<sub>2</sub>O. Para las reacciones se prepararon un volumen final de 10  $\mu$ L, incorporándose a los tubos 8  $\mu$ L de la mezcla, más 1  $\mu$ L de X-M13 y 1  $\mu$ L de Primer. Posteriormente se elaboró un programa de amplificación en un termociclador con las siguientes condiciones: Primero una fase de desnaturalización inicial a 94°C por 3 minutos, segundo una fase de desnaturalización de 94°C por 30 segundos, tercero una fase de hibridación del cebador a 60°C por 30 segundos y finalmente la fase extensión del DNA a 72°C por 5 minutos, todo ello con un total de 35 ciclos. Los productos de los PCR multiplex fueron llevados a la empresa MAJORBIO, Shanghai Majorbio Bio-pharm Technology Co. Ltd. Guangzhou Branch para el secuenciamiento.

### **3.4. Análisis de los datos**

Los electroferogramas obtenidos del secuenciamiento fueron analizados con el programa GeneMarker V.1.5 (Val), State College, PA 16803, USA con la finalidad de asignar los pesos moleculares para los alelos obtenidos (Figura N°10). El programa realiza análisis de fragmentos de datos de cuatro o cinco colores desde cualquier gel o sistema de electroforesis capilar; también corrige los problemas de genotipado como picos saturados y datos ruidosos.

Los alelos que son representados como picos en los electroferogramas, se miden en URF (unidades de fluorescencia) y para considerarse un verdadero alelo, y no ruido, debe superar los 100 URF (Acuña, 2016). Una vez obtenido los pesos moleculares, se exportó la data a formato Excel para analizar los datos de los genotipos.

Para las mediciones de la diversidad genética se usó los programas Cervus 3.0.7, GenA1EX, donde se obtuvieron número de alelos y frecuencias alélicas por locus, también con el mismo programa, se

obtuvieron valores de heterocigosidad observada ( $H_o$ ), heterocigosidad esperada ( $H_e$ ) por locus y heterocigosidad promedio; con el programa Cervus se calculó el Índice de Contenido Polimórfico (PIC). El Equilibrio de Hardy-Weinberg (EHW) se evaluó con el programa Genepop 4.7.5 y la prueba de AMOVA (Meirmans, 2012), utilizando las distancias genéticas; para ésta última prueba también se usó el programa Arlequín versión 3.5 (Excoffier y Lischer 2010), corroboradas con el programa GenAIEX. Por otro lado, la estructuración genética poblacional fue evaluada primero con el programa Genetix y posteriormente con el programa STRUCTURE v.2.3 (Pritchard et al. 2010), dónde se trabajó con un rango de agrupamiento de  $K=1$  a  $K=10$  y con el programa STRUCTURE HARVESTER Web v0.6.94 (Earl y VonHoldt, 2012), dónde se utilizó los archivos de las probabilidades likelihood generadas; finalmente con el método Delta K (Evanno et al. 2005) se obtuvo el valor de  $K$  óptimo basado en el método de probabilidad logarítmica.

## CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

### 4.1. Resultados

#### 4.1.1. Desarrollo de marcadores Microsatélites (SSR)

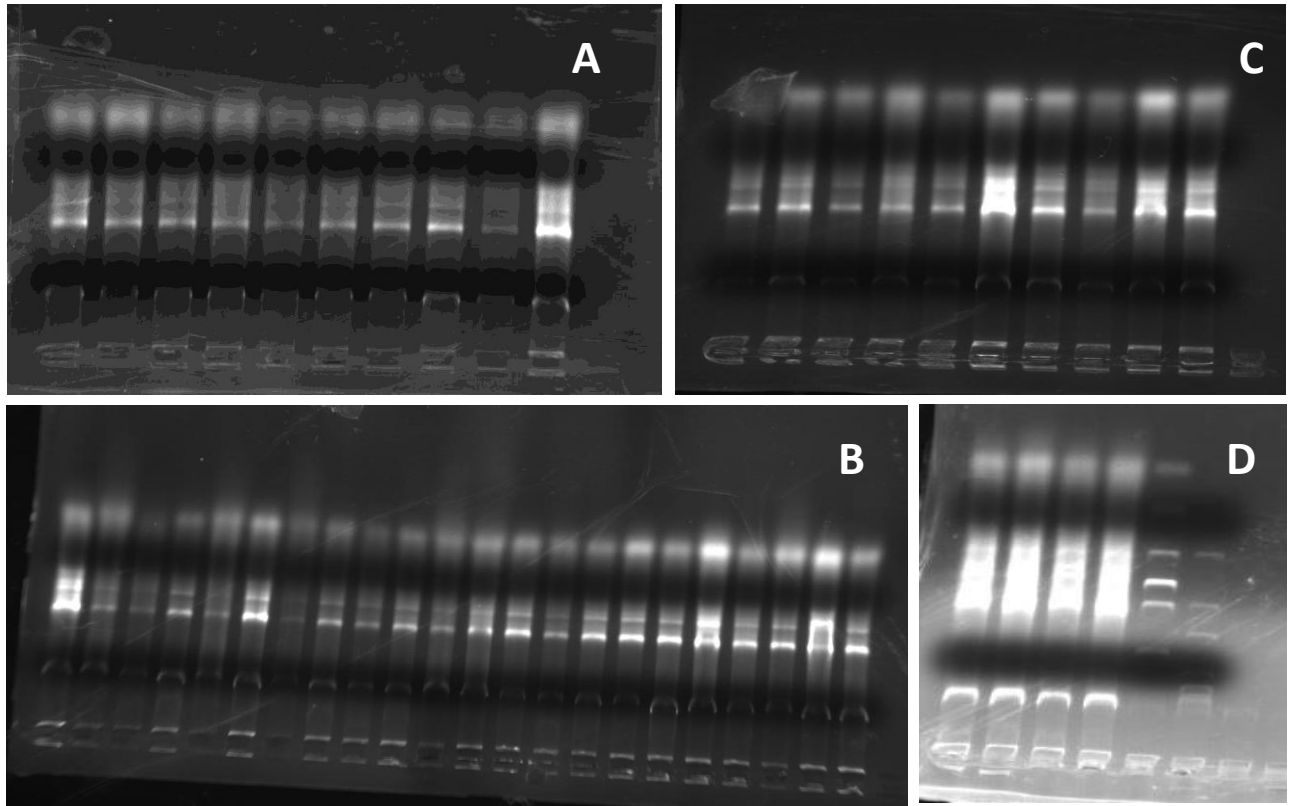
La construcción de las bibliotecas ("libraries") se secuenciaron en una plataforma Illumina X Ten (Illumina, San Diego, California, EE.UU). Las longitudes de las lecturas fueron de 150 pbs, *P. raimondii* tuvo 10 060 499 de lecturas, *P. macrura* tuvo 10 514 311 de lecturas y *P. hutchinsonii* tuvo 10 559 719 de lecturas, aproximadamente 10 millones de lecturas sin procesar, dónde las secuencias fueron depositadas dentro de un archivo de lectura en el Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI). Además, se obtuvieron 95 000 secuencias ensambladas (más de 590 pb) para cada especie, todo ello codificado con número de BioProject: PRJNA562459, PRJNA562611, número SRA: srr10023784, SRR10023783, SRR10028124.

Las lecturas de la biblioteca de cada especie fueron ensambladas utilizando SPAdes 3.13.0 (Bankevich et al., 2012). Las regiones de microsatélites fueron cribadas en el genoma ensamblado de *P. raimondii*, utilizando la herramienta de búsqueda de microsatélites SciRoKo 3.4 (Kofler et al., 2007), los pares de cebadores para microsatélites se diseñaron utilizando Primer3web 4.1.0 (Untergasser et al., 2012) con la configuración de parámetros predeterminados descritos en la metodología. Se identificaron 220 marcadores microsatélites de *P. raimondii* que incluyen 110 de dos nucleótidos, 80 de tres nucleótidos, 25 de cuatro nucleótidos , 20 de cinco nucleótidos y 15 de seis nucleótidos; es decir (50%, 22.7%, 11.3%, 9% y 7%, respectivamente). Se verificó la homología de cada locus en los genomas ensamblados de *P. marura* y *P. hutchinsonii* utilizando BioEdit 7.0.9.0 (Hall, 1999). Finalmente, en total se seleccionaron 70 marcadores microsatélites (SSR) de especies cruzadas para el diseño y síntesis del cebador (Majorbio Company, Shanghai, China).

#### 4.1.2. Extracción de DNA

Los resultados que se obtuvieron de la extracción de DNA a partir de muestras de hojas utilizando el protocolo modificado de Doyle & Doyle (1989) fueron observadas mediante imágenes de los geles de agarosa, dónde inicialmente no fueron de buena calidad, ya que se observaron varias bandas no tan claras (Figura N°8); se volvieron a realizar las extracciones realizando el proceso de trituración

manual de manera más rápida para evitar la desnaturalización del DNA para cada uno de los individuos de las tres poblaciones en estudio, fue un proceso arduo ya que las hojas de *Puya raimondii* son duras y difícilmente se desintegran con el nitrógeno líquido, todo ello permitió obtener imágenes de geles de agarosa más claras y con una sola banda (Figura N°8); además se observó que la calidad de DNA era mejor en fracciones de hojas más tiernas.



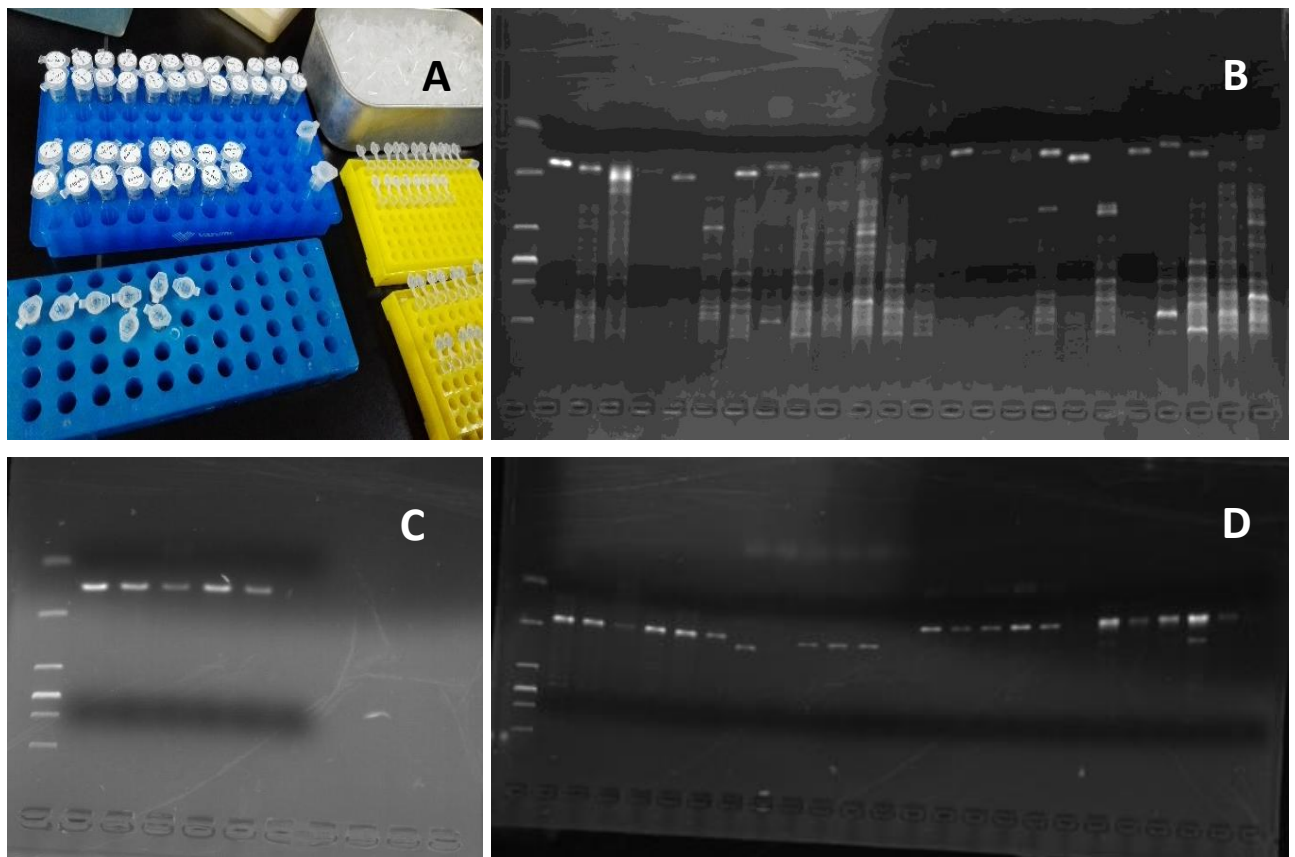
**Figura N° 8.** A y B: Imágenes de geles de agarosa al 1% donde se muestran celdas que representa individuos de *Puya raimondii*, las celdas con una banda más claras son las que presentan buena calidad de DNA, C: Imagen de gel de agarosa al 1% con celdas de una banda que presentan buena calidad de DNA, excepto para la celda 7 y 9, D: Imagen de gel de agarosa al 1% donde muestra celdas con bandas no claras que presentan mala calidad de DNA.

#### 4.1.3. Amplificación de los marcadores Microsatélites

Los productos de PCR fueron escaneados por un analizador genético ABI PRISM 3100, utilizando el estándar de Tamaño interno GeneScan 500 LIZ (Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts, EE.UU.) y la amplificación se realizó con tres cebadores (directo de secuencia específica, inverso de secuencia específica y universal), marcado con tres fluoróforos (FAM, HEX y TAMRA). El "screening" preliminar del PCR dio como amplificación exitosa de 46 pares de marcadores

microsatélites (SSR) de los 70 pares de marcadores SSR que se seleccionaron al diseñar los marcadores.

Los 46 pares de marcadores microsatélites (SSR) en *P. raimondii* tuvieron una banda clara para cada uno (Figura N°9), los cuales fueron analizados para determinar cuántos resultaban polimórficos; para ello se seleccionaron individuos de las poblaciones en estudio, donde se realizaron pruebas de PCR y fueron observadas mediante imágenes de gel de agar al 2%, las imágenes que presentaban una banda clara para cada uno de los individuos de las poblaciones representaban buenos marcadores microsatélites (SRR), tal como se observa en la figura N°9; posteriormente se prepararon mezclas que contenían los marcadores SSR con los fluoróforos respectivos para los 84 individuos (Tabla N°5) los que fueron enviados a la compañía Majorbio, dónde se identificó el polimorfismo. En total, resultaron 12 pares de marcadores polimórficos (Tabla N°6) de los 42 marcadores que se seleccionaron, en el Anexo N°6.3 se muestran los 34 que resultaron monomórficos en *P. raimondii*.



**Figura N° 9.** A: Imagen de los marcadores Microsatélites codificados, B: Imagen de gel de agarosa al 2% donde se muestran celdas con bandas no claras que no representa buenos marcadores SRR para *P. raimondii*, C y D: Imágenes de geles de agarosa al 2% con celdas de una banda que presentan buenos marcadores SSR para individuos de *Puya raimondii*.

**Tabla N° 5.** Lista de marcadores microsatélites (SSR), fluoróforos y mezcla de marcadores para el análisis de polimorfismo en *P. raimondii*.

Fluoróforos	Marcadores microsatélites (SSR)						
TAMRA	Puya-004	Puya-067	Puya-016	Puya-052	Puya-061	Puya-057	Puya-069
HEX	Puya-012	Puya-042	Puya-055	Puya-031	Puya-046	Puya-049	Puya-022
FAM	Puya-002	Puya-009	Puya-011	Puya-039	Puya-058	Puya-065	-

A1=Puya-002+Puya-012

A2=Puya-009+Puya042

A3=Puya-039+Puya-046+Puya-016

A4=Puya-065+Puya-049

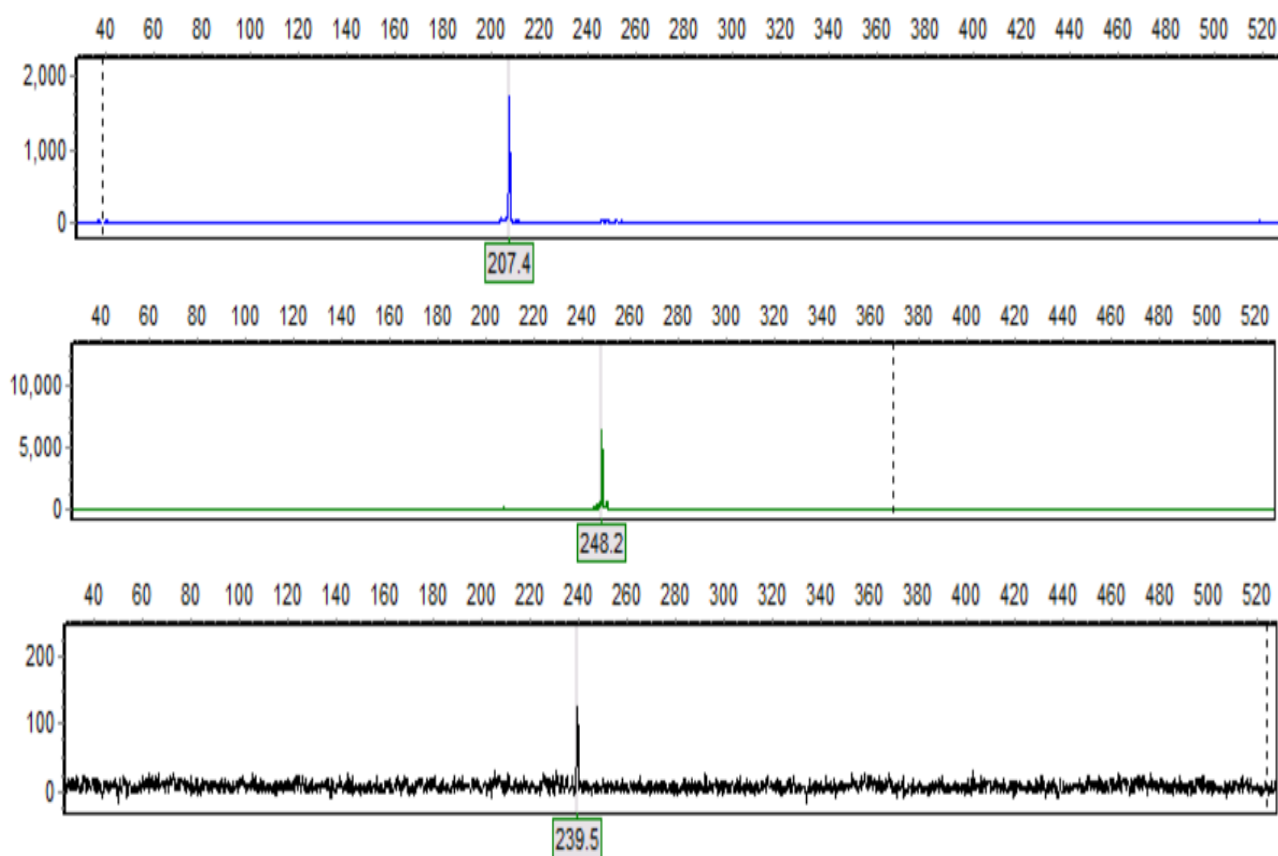
A5=Puya-069+Puya-037

**Tabla N° 6.** Características de los 12 marcadores microsatélites (SRR) polimórficos identificados en *Puya raimondii*.

Locus*	Secuencia de marcadores (5'- 3') Directa (F) e Inversa (R)	Repeat motif	Allele size range(bp)	Fluoróforo	N° de accesión en GenBank
Puya-002	F: CTCTCTGCGCCATCACATTA R: TCGTGATCGGGTTGATCTT	(GGT) <sub>8</sub> ...(GGTGA) <sub>6</sub>	199-216	FAM	MN218732
Puya-009	F: TATGTACCCGATCCGAACC R: TACCCGACCCGACCAAATA	(ATTTT) <sub>6</sub> ...(TTCGGG) <sub>4</sub>	207-222	FAM	MN218735
Puya-012	F: CTTTCGTATGGGAAGGTGA R: CGAGCCAAGAAAGATGAAGG	(TAAAA) <sub>4</sub> ...(CT) <sub>6</sub>	246-263	HEX	MN218737
Puya-016	F: GTCCTCGACATCTTCCAGA R: TGC GGAACGAAAAATAGATG	(AAAG) <sub>5</sub>	180-194	TAMRA	MN218740
Puya-037	F: GCTTTGGGTTCAACGGTCTA R: GCGGAGACTAAGAGGACGAA	(TTC) <sub>5</sub> ...(GA) <sub>8</sub>	240-248	HEX	MN2187753
Puya-039	F: GCCCATGTATGTGCGTGTAT R: CCCTCTCCACTGCTTCC	(GA) <sub>7</sub>	190-202	FAM	MN218754
Puya-042	F: AAGGAATTATGAGCGCATGG R: TGTGAACCCACAGAATCAGC	(AG) <sub>19</sub>	180-194	HEX	MN218755
Puya-046	F: AGGGCTCCTTCTCTCTCCTG R: GGCCAGAGGTAAAGGGGTAG	(CT) <sub>12</sub>	200-213	HEX	MN218756

Locus*	Secuencia de marcadores (5'- 3') Directa (F) e Inversa (R)	Repeat motif	Allele size range(bp)	Fluoróforo	N° de accesión en GenBank
<b>Puya-049</b>	F: GCAAAATACACGAAGGAAGC R: GGGATGGTGAAGAAATGGTG	(TC) <sub>6</sub>	210-222	HEX	MN218757
<b>Puya-052</b>	F: TGCGGAAACAGAGAAGAACC R: CTGCTGCAGCTCCTCTTAGG	(CT) <sub>13</sub>	202-210	TAMRA	MN218760
<b>Puya-065</b>	F: TTGGGACTTCCAGGTCCTC R: GAGAGAAGGAGCCCTCATCA	(CT) <sub>7</sub> ... (CT) <sub>7</sub>	272-284	FAM	MN218769
<b>Puya-069</b>	F: AGGGGAGCTCTCTTGGAGAC R: AAACAGAAACCAACCGCAAC	(TA) <sub>7</sub>	187-212	TAMRA	MN218772

\* 60°C de temperatura de alineación para todos los loci.



**Figura N° 10.** Ejemplo de Electroferogramas de microsatélites (SSR) obtenidos a partir del DNA de *Puya raimondii* usando el programa GeneMarker. A) Fluoróforo FAM, B) Fluoróforo HEX y C) Fluoróforo TAMRA.



#### 4.1.4. Medición de la diversidad genética

##### 4.1.4.1. Número de alelos (A)

Para los 12 marcadores polimórficos (loci), el número de alelos por locus el rango fue de uno hasta nueve, tal como se describe en la Tabla N°7; además los marcadores Puya-002, Puya-012 y Puya-046 tienen altos números de alelos.

**Tabla N° 7.** Número de alelos para las poblaciones de Yanacancha (sector Cachi y sector Huáscar), Choconchaca y Pachapaqui de *P. raimondii*

Locus	Cachi (N = 15)		Huáscar (N=14)		Choconchaca (N=27)		Pacahapaqui (N=28)		A <sub>T</sub>
	A	Ae	A	Ae	A	Ae	A	Ae	
Puya-002	5	1.536	6	2.465	9	2.751	1	1.000	13
Puya-009	1	1.000	2	1.385	1	1.000	1	1.000	2
Puya-012	5	1.779	2	1.153	3	1.252	4	1.457	8
Puya-016	1	1.000	1	1.000	3	1.455	2	1.077	5
Puya-037	2	0.580	2	1.849	3	1.446	1	1.000	3
Puya-039	2	1.153	4	1.943	2	1.492	1	1.000	6
Puya-042	2	1.142	3	2.178	2	1.912	1	1.000	3
Puya-046	2	1.087	6	2.481	3	1.244	1	1.000	7
Puya-049	2	1.471	3	1.446	4	3.605	2	1.038	5
Puya-052	1	1.000	1	1.000	3	2.101	2	1.159	3
Puya-065	1	1.000	3	1.338	5	1.364	1	1.000	6
Puya-069	1	1.000	2	1.198	2	1.180	2	1.077	3

A=número de alelos, Ae= número de alelos efectivos, A<sub>T</sub>=número de alelos total

##### 4.1.4.2. Frecuencias alélicas

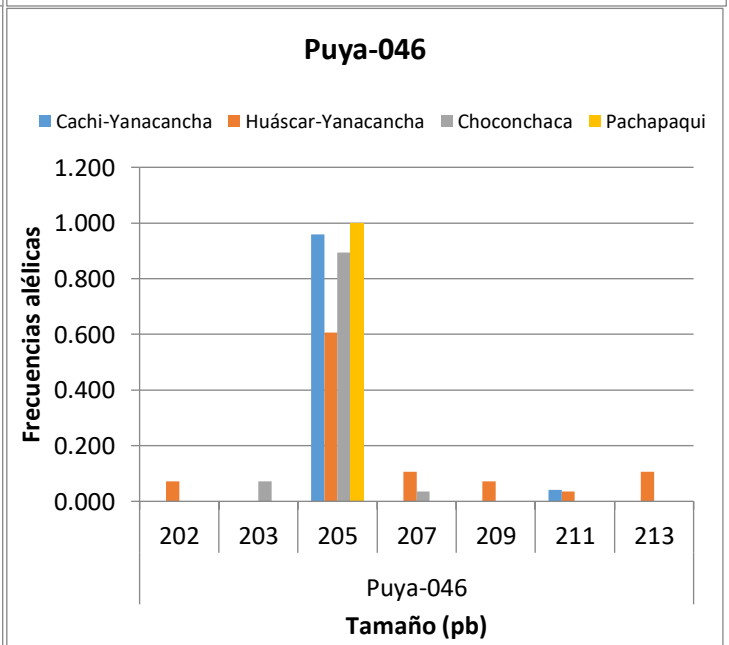
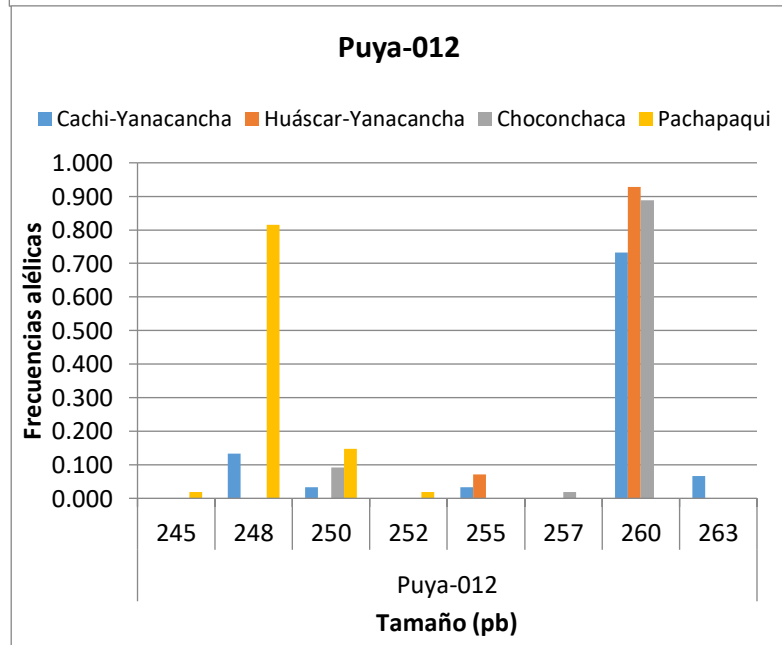
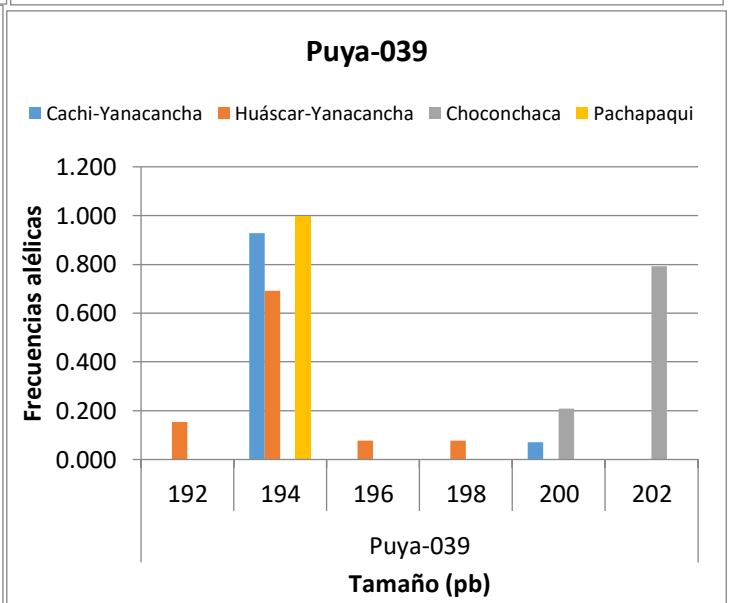
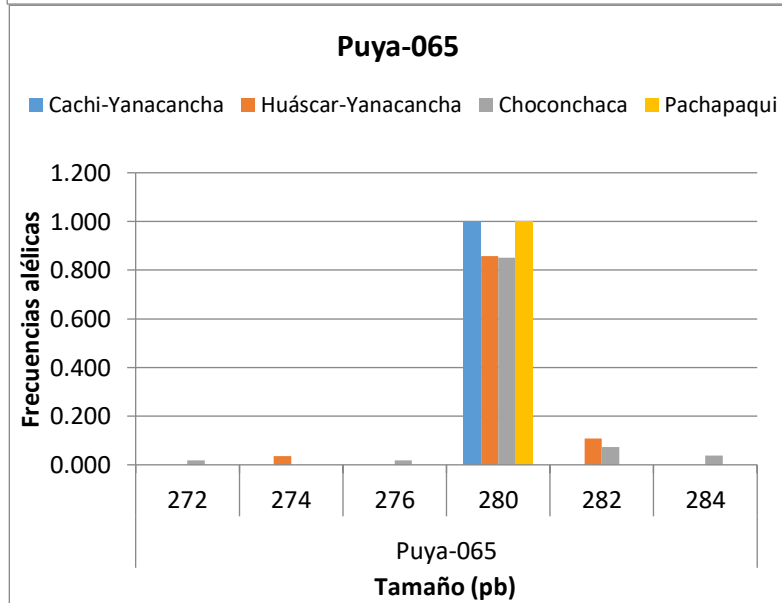
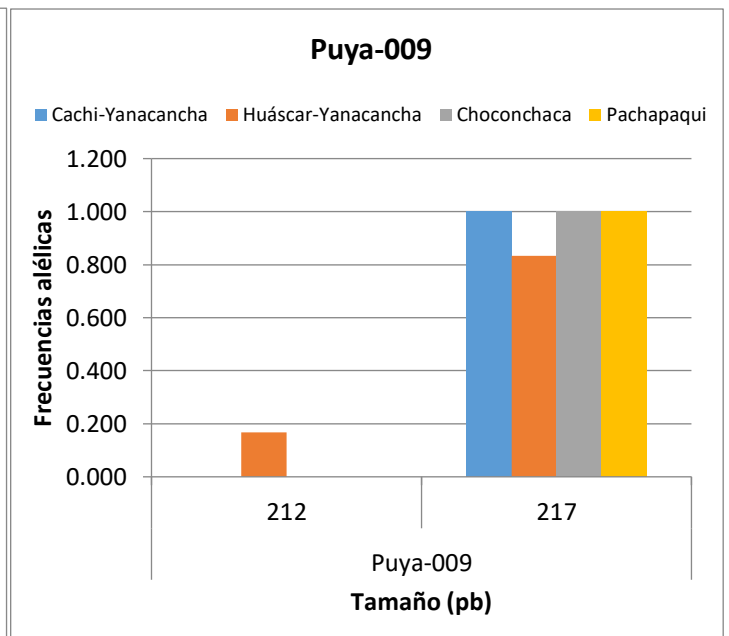
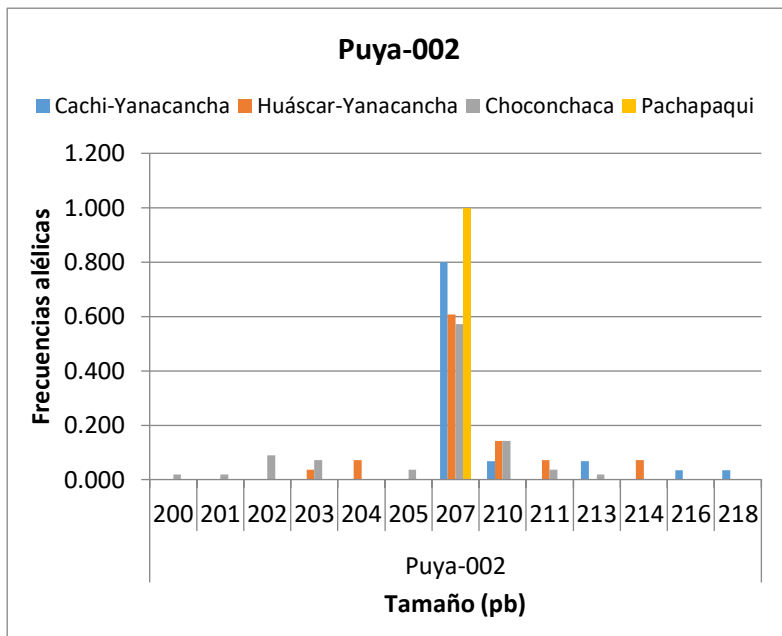
El loci Puya-002 registró el mayor número de alelos (13) y presentó el alelo más común de 207 pb en todas las poblaciones; a diferencia del alelo de 210 pb que presentó baja frecuencia, excepto para la población de Pachapaqui. La población de Choconchaca presentó cuatro alelos exclusivos de 200 pb, 201 pb, 202 pb y 205 pb con baja frecuencia; mientras que el sector Cachi de la población de Yanacancha presentó dos alelos exclusivos de 216 pb y 218 pb, del mismo modo el sector Huáscar de la misma población presentó dos alelos exclusivos de 204 pb y 214 pb; todos ellos con baja frecuencia. El loci Puya-009 registró el menor número de alelos y presentó el alelo más común de 217 pb con alta frecuencia en todas las localidades, sólo el sector Huáscar presentó un alelo exclusivo de 212 pb con baja frecuencia (Figura N° 11).

El loci Puya-065 registró para todas las poblaciones el alelo más común de 280 pb, por otro lado, la población de Choconchaca presentó tres alelos exclusivos de 272 pb, 276 pb y 284 pb; mientras el sector Huáscar de la población de Yanacancha presentó un alelo exclusivo de 274 pb de baja frecuencia. El loci Puya-039 registró el alelo común de 194 pb para todas las poblaciones, excepto para la población de Choconchaca, ésta última presentó un alelo exclusivo de 202 pb con alta frecuencia; mientras para el sector de Huáscar presentó tres alelos exclusivos de 192pb, 196 pb y 198 pb con baja frecuencia (Figura N°11).

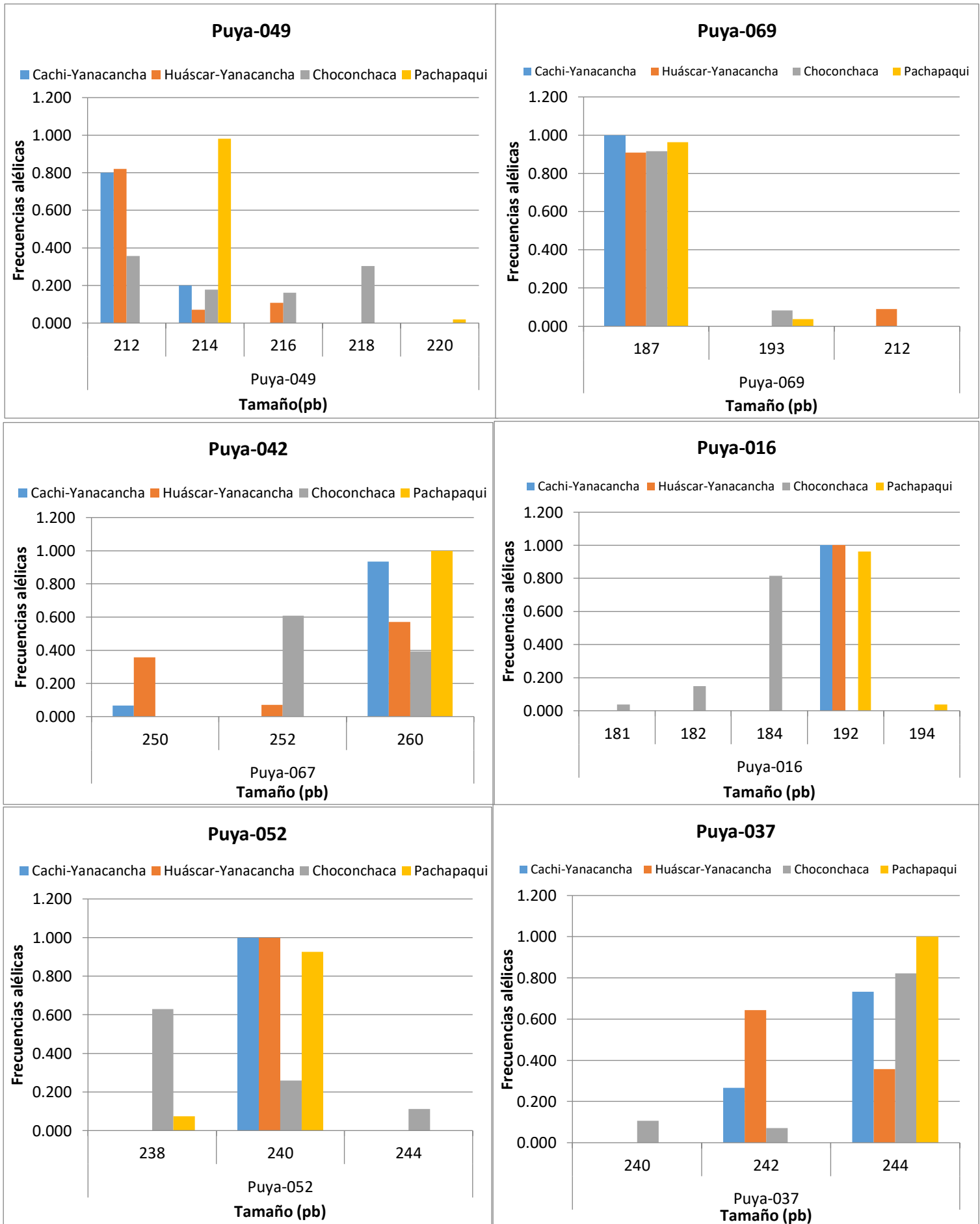
El loci Puya-012 registró un alelo común de 260 pb para todas las poblaciones, excepto para la población de Pachapaqui; dónde presentó dos alelos exclusivos con baja frecuencia de 245 pb y 252 pb; mientras la población de Choconchaca presentó un alelo exclusivo de 257 pb; finalmente el sector Cachi de la población de Yanacancha presentó un alelo exclusivo de 263 pb (Figura N°11).

El loci Puya-046 presentó un alelo común de alta frecuencia de 205 pb para todas las poblaciones; mientras para el sector Huáscar de la población de Yanacancha presentó tres alelos exclusivos de 202 pb, 209 pb y 213 pb de baja frecuencia; a diferencia de la población de Choconchaca presentó un alelo exclusivo de 203 pb (Figura N°11).

El loci Puya-049 presentó un alelo común de 214 pb para todas las poblaciones, pero con frecuencias bajas a excepto para la población de Pachapaqui; mientras que para el alelo de 212 pb presentan frecuencias altas pero no existe registro para la población de Pachapaqui, para ésta última población se presentó un alelo exclusivo de 220 pb con baja frecuencia; mientras que para la población de Choconchaca presentó un alelo exclusivo de 218 pb (Figura N° 12).



**Figura N° 11.** Distribución de las frecuencias alélicas de los loci Puya-002, 009, 065, 039, 012 y 046.



**Figura N° 12.** Distribución de las frecuencias alélicas de los loci Puya-049, 069, 067, 016, 052 y 037.

El loci Puya-069 presentó un alelo en común de 187 pb con alta frecuencia para todas las poblaciones; mientras que para el sector de Huáscar de la población de Yanacancha presentó un alelo exclusivo con baja frecuencia de 212 pb (Figura N° 12).

El loci Puya-042 presentó un alelo en común de 260 pb para todas las poblaciones, para éste loci no se registraron alelos exclusivos para cada una de las poblaciones en estudio (Figura N° 12).

El loci Puya-016 presentó un alelo en común de 192 pb con alta frecuencia para las poblaciones de Pachapaqui y los sectores de Cachi y Huáscar en la población de Yanacancha; mientras que para la población de Choconchaca presentó tres alelos exclusivos de 181 pb, 182 pb y 184 pb, siendo ésta última con mayor frecuencia; por otro lado la población de Pachapaqui presentó un alelo exclusivo de 194 pb con baja frecuencia (Figura N° 12).

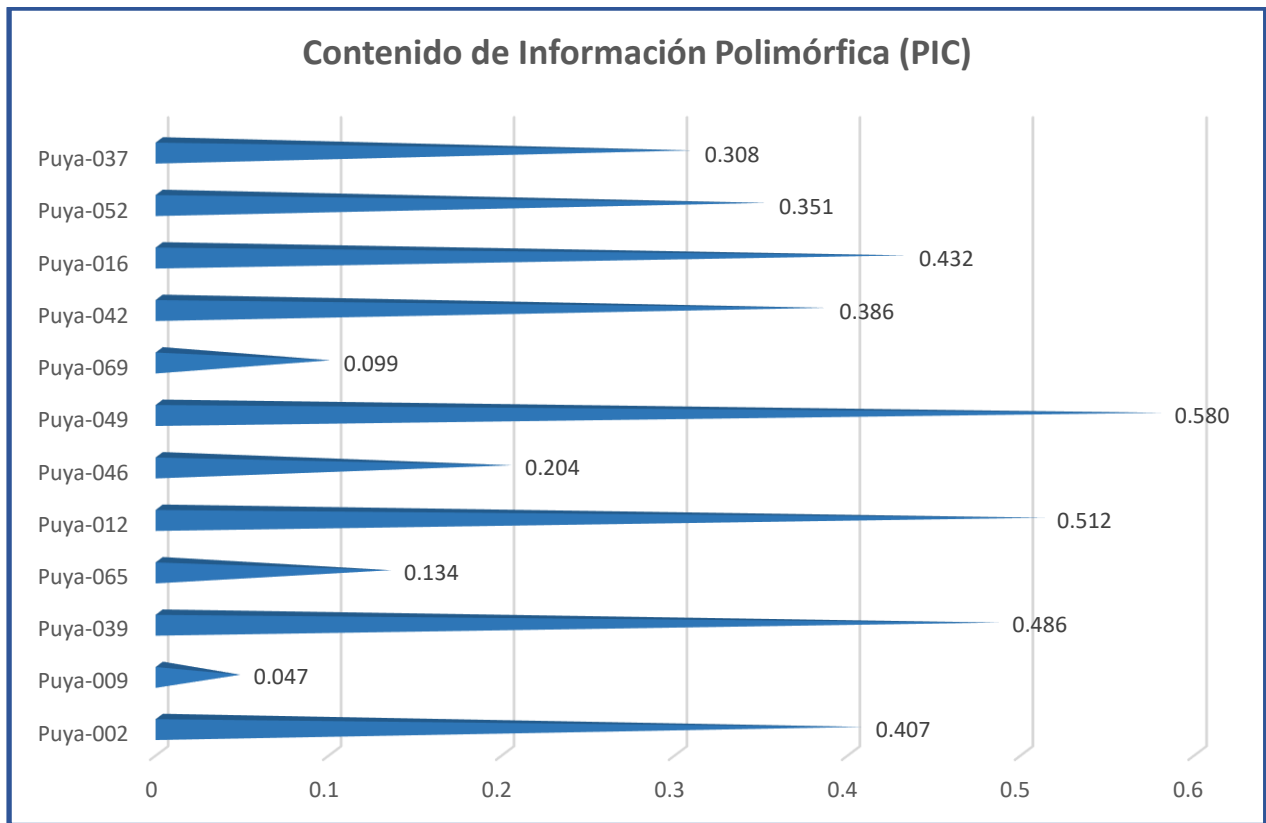
El loci Puya-052 presentó un alelo en común de 240 pb para todas las poblaciones; mientras que para la población de Choconchaca presentó un alelo exclusivo de 244 pb con baja frecuencia. Finalmente para el loci Puya-037 presentó un alelo en común de 244 pb para todas las poblaciones; mientras que para la población de Choconchaca se registró un alelo exclusivo de 240 pb con baja frecuencia (Figura N° 12)

#### 4.1.4.4. Índice de Contenido Polimórfico (PCI)

**Tabla N° 8.** Estimación de heterocigosidad observada, heterocigosidad esperada e índice de contenido polimórfico en la población total.

<b>Locus</b>	<b>Ho</b>	<b>He</b>	<b>PIC</b>
<b>Puya-002</b>	0.190	0.421	0.407
<b>Puya-009</b>	0	0.048	0.047
<b>Puya-039</b>	0	0.543	0.486
<b>Puya-065</b>	0.036	0.138	0.134
<b>Puya-012</b>	0.072	0.578	0.512
<b>Puya-046</b>	0.037	0.209	0.204
<b>Puya-049</b>	0.333	0.651	0.580
<b>Puya-069</b>	0	0.103	0.099
<b>Puya-042</b>	0	0.441	0.386
<b>Puya-016</b>	0	0.502	0.432
<b>Puya-052</b>	0	0.412	0.351
<b>Puya-037</b>	0	0.352	0.308

Ho= Heterocigosidad observada, He= Heterocigosidad esperada  
Calculada por el Software Cervus 3.0.7



**Figura N° 13.** Estimación del PIC en la población total

#### 4.1.4.5. Heterocigosidad

Los valores de heterocigosidad esperada ( $H_e$ ) en las poblaciones variaron desde 0 para los locus Puya-009, Puya-016, Puya-052, Puya-065, Puya-037, Puya-039, Puya-042, Puya-046 y Puya-069; mientras el valor máximo resultó 0.723 en el locus Puya-049; por otro lado los valores de la heterocigosidad observada ( $H_o$ ) varió desde 0 para los locus Puya-009, Puya-016, Puya-037, Puya-039, Puya-042, Puya-049, Puya-052, Puya-065 y Puya-069, hasta el valor máximo de 0.929 en el locus Puya-049. Además, al analizar todos los loci no se muestra uniformidad que la  $H_e$  sea mayor que la  $H_o$ ; ya que para ciertos loci el valor de  $H_o$  es mayor que  $H_e$  y viceversa. Para el análisis por localidad de estudio, el sector Cachi de la población Yanacancha presentó rango de  $H_e$  de 0 a 0.438, mientras que el sector Huáscar de la población Yanacancha presentó un rango de  $H_e$  de 0 a 0.597, para la localidad de Pachapaqui presentó rango de 0 a 0.313 y finalmente para la localidad de Choconchaca presentó un rango de 0 a 0.723, siendo los locus Puya-012, Puya-046, Puya-012 y Puya-049 los que muestra los mayores valores de  $H_e$  respectivamente para cada localidad. Por otro lado, las localidades mostraron una  $H_e$  promedio de 0.153, 0.318, 0.052 y 0.344 para la localidad de Cachi, Huáscar, Pachapaqui y Choconchaca respectivamente (Tabla N°9).

**Tabla N° 9.** Estimación de la heterocigosidad calculada para las poblaciones en estudio de *P. raimondii*, utilizando 12 loci.

Locus	Cachi (N = 15)		Huáscar (N=14)		Choconchaca (N=27)		Pacahapaqui (N=28)		Promedio	
	Ho	He	Ho	He	Ho	He	Ho	He	Ho	He
<b>Puya-002</b>	0.200	0.349	0.214	0.594	0.000	0.636	0.000	0.000	0.193	0.395
<b>Puya-009</b>	0.000	0.000	0.000	0.278	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.069
<b>Puya-012</b>	0.067	0.438	0.000	0.133	0.148	0.201	0.037	0.313	0.063	0.271
<b>Puya-016</b>	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.313	0.000	0.071	0.000	0.096
<b>Puya-037</b>	0.000	0.391	0.000	0.459	0.000	0.309	0.000	0.000	0.000	0.290
<b>Puya-039</b>	0.000	0.133	0.000	0.485	0.000	0.330	0.000	0.000	0.000	0.237
<b>Puya-042</b>	0.000	0.124	0.000	0.541	0.000	0.477	0.000	0.000	0.000	0.286
<b>Puya-046</b>	0.083	0.080	0.143	0.597	0.000	0.196	0.000	0.000	0.057	0.218
<b>Puya-049</b>	0.000	0.320	0.071	0.309	0.929	0.723	0.037	0.036	0.259	0.347
<b>Puya-052</b>	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.524	0.000	0.137	0.000	0.165
<b>Puya-065</b>	0.000	0.000	0.071	0.253	0.074	0.267	0.000	0.000	0.036	0.130
<b>Puya-069</b>	0.000	0.000	0.000	0.165	0.000	0.153	0.000	0.071	0.000	0.097
<b>Promedio</b>	0.029	0.153	0.042	0.318	0.126	0.344	0.006	0.052	0.051	0.217

Ho= Heterocigosidad observada, He= Heterocigosidad esperada

Por otro lado, también se realizaron análisis de heterocigosidad para las especies que se utilizaron en el diseño de los marcadores SSR para *P. raimondii*. Las tasas de éxito de amplificación entre especies en *P. hutchisonii*, *P. macropoda* y *P. macrura* resultaron que de 14-18 loci de los 46 loci (SSR) desarrollados, podrían tener éxito amplificando en este conjunto de taxones mostrados en la Tabla N°10, entre estos loci de amplificación cruzada; seis, catorce y trece son polimórficos para *P.hutchisonii*, *P. macropoda* y *P. macrura* respectivamente; y monomórficos resultaron uno, cuatro y dos para *P.hutchisonii*, *P. macropoda* y *P. macrura* respectivamente.

Los resultados demuestran que los pares de marcadores SSR pueden ser de gran utilidad en todo el género *Puya*.

**Tabla N° 10.** Estimación del número de alelos, heterocigosidad calculada para las especies relacionadas con *P. raimondii*.

Locus	<i>Puya macrura</i> (N=5)				<i>Puya macropoda</i> (N=4)				<i>Puya hutchisonii</i> (N=2)			
	A	Ho	He	RTA (bp)	A	Ho	He	RTA (bp)	A	Ho	He	RTA (bp)
<b>Puya-002</b>	6	1.0000	0.8889	209-224	2	0.5000	0.4286	210-213	1	-	-	215
<b>Puya-004</b>	7	0.8000	0.9111	197-227	3	0.5000	0.7143	209-215	2	1.0000	0.6667	211-213
<b>Puya-008</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	2	1.0000	0.0667	214-248
<b>Puya-014</b>	3	0.2000	0.6000	263-271	2	1.0000	0.5714	263-267	-	-	-	-
<b>Puya-015</b>	-	-	-	-	1	-	-	214	1	-	-	210
<b>Puya-016</b>	2	0.2000	0.2000	242-246	2	1.0000	0.5714	242-246	2	1.0000	0.6667	242-246
<b>Puya-017</b>	2	0.5000	0.5000	244-248	1	0.0000	0.0000	244	1	-	-	246
<b>Puya-022</b>	3	0.2000	0.3778	163-193	6	0.7500	0.9286	169-202	2	1.0000	0.6667	182-188
<b>Puya-028</b>	3	0.6667	0.6000	208-226	3	0.0000	0.7143	220-226	1	-	-	221
<b>Puya-030</b>	5	0.8000	0.8444	243-250	5	0.7500	0.8571	240-254	1	-	-	246
<b>Puya-031</b>	4	0.6000	0.7778	260-269	2	0.3333	0.3333	260-263	1	-	-	259
<b>Puya-033</b>	1	-	-	306	1	-	-	306	1	-	-	305
<b>Puya-034</b>	1	-	-	243	1	-	-	243	-	-	-	-
<b>Puya-037</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	245
<b>Puya-042</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	2	1.0000	0.6667	177-181
<b>Puya-049</b>	-	-	-	-	2	0.5000	0.4286	213-215	1	-	-	215
<b>Puya-052</b>	-	-	-	-	2	0.0000	0.5714	240-242	2	1.0000	0.6667	277-241
<b>Puya-053</b>	2	0.0000	0.6667	266-268	3	0.5000	0.6786	264-270	-	-	-	-
<b>Puya-054</b>	4	0.4000	0.5333	198-208	3	0.2500	0.75	206-209	1	-	-	207
<b>Puya-055</b>	4	0.4000	0.8000	172-184	3	0.5000	0.6071	175-184	-	-	-	-
<b>Puya-067</b>	5	0.8000	0.7556	254-266	2	0.2500	0.2500	254-258	1	-	-	257
<b>Total</b>	-	0.3127	0.4026	-	-	0.3254	0.4002	-	-	0.2857	0.1905	-

A=Número de alelos, He=Heterocigosidad esperada, Ho=Heterocigosidad observada, RTA= Rango del tamaño del alelo



#### 4.1.4.6. Equilibrio Hardy-Weinberg (EHW)

Los resultados obtenidos de la evaluación del EHW asumieron como hipótesis nula de que existe un equilibrio de HW, al realizar el análisis por población (Tabla N°11), se observa que para la población de Yanacancha, sector Cachi muestran valores significativos para seis loci (Puya-002, Puya-039, Puya-012, Puya-049, Puya-067, Puya-037) con desviación del EHW; a diferencia de seis loci que no mostraron resultados por ser monomórficos (Puya-009, Puya-065, Puya-046, Puya-069, Puya-016 y Puya-052). Para el sector Huáscar de la misma población 10 loci resultaron con desviación del EHW (Puya-002, Puya-009, Puya-039, Puya-065, Puya-012, Puya-046, Puya-049, Puya-069, Puya-067 y Puya-037) y sólo dos loci fueron monomórficos (Puya-016 y Puya-052). La población de Choconchaca mostró dos loci sin desviación del EHW (Puya-012 y Puya-049), los demás resultaron valores significativos, también se encontró que sólo un locus (Puya-009) resultó monomórfico; finalmente la población de Pachapaqui mostró cuatro loci con desviación del EHW (Puya-012, Puya-069, Puya-016 y Puya-052) y se obtuvieron 8 loci sin resultados por ser monomórficos (Puya-002, Puya-009, Puya-039, Puya-065, Puya-046, Puya-049, Puya-067 y Puya-037).

**Tabla N° 11.** EHW evaluado para los doce locus en las poblaciones de Yanacancha (sector Cachi y sector Huáscar), Choconchaca y Pachapaqui.

Locus	Cachi-Yanacancha	Huáscar-Yanacancha	Choconchaca	Pachapaqui
	P-value	P-value	P-value	P-value
<b>Puya-002</b>	0.0102	0.0000	0.0000	-
<b>Puya-009</b>	-	0.0061	-	-
<b>Puya-039</b>	0.0346	0.0000	0.0000	-
<b>Puya-065</b>	-	0.0034	0.0000	-
<b>Puya-012</b>	0.0000	0.0361	0.1871	0.0000
<b>Puya-046</b>	-	0.0000	0.0000	-
<b>Puya-049</b>	0.0006	0.0042	0.9985	-
<b>Puya-069</b>	-	0.0491	0.0015	0.0191
<b>Puya-042</b>	0.0343	0.0000	0.0000	-
<b>Puya-016</b>	-	-	0.0000	0.0178
<b>Puya-052</b>	-	-	0.0000	0.0013
<b>Puya-037</b>	0.0003	0.0001	0.0000	-

ns= no significativo, \* P<0.05, \*\* P<0.01, \*\*\* P<0.001

Calculada con el programa Genepop 4.7.5

#### 4.1.5. Análisis de la estructura poblacional

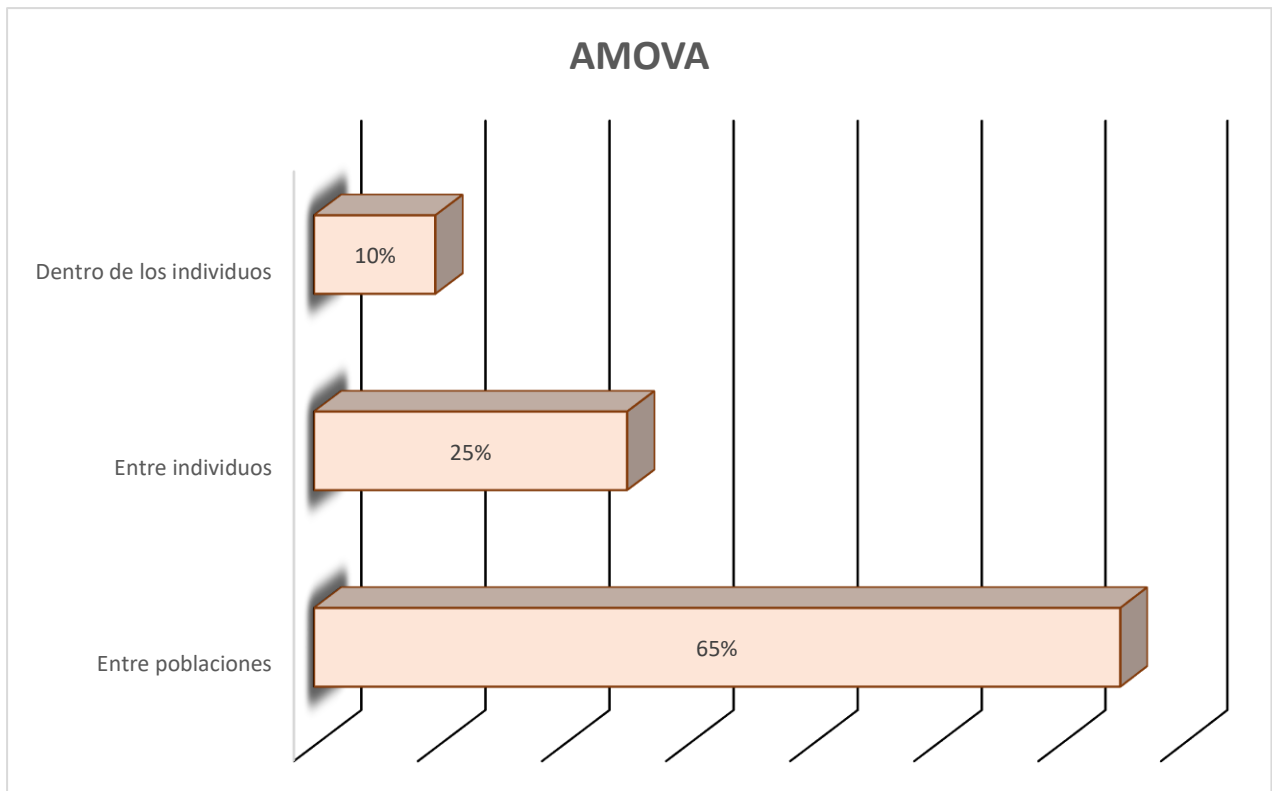
##### 4.1.5.1. AMOVA y Estadísticos F y R

En el análisis con la prueba de AMOVA se obtuvo que el 65 % de la variación genética se da a nivel poblacional; es decir la variación genética es elevada entre cada una de las poblaciones evaluadas. A diferencia de la variación genética dentro de los individuos, dónde se obtuvo un valor bajo de 10% (Figura N°14). Mediante el AMOVA también se obtuvieron los estadísticos F y R, bajo los modelos de varianza al azar y Stepwise Mutation respectivamente. Para el coeficiente de fijación  $F_{ST}$  resultó 0.426 que de acuerdo al rango de 0-1 indica un valor de  $F_{ST}$  muy alto, el valor de  $F_{IS}$  resultó 0.776, valor que de acuerdo al rango -1 a 1, indicaría deficiencias de heterocigotos. Por otro lado, el valor de  $R_{ST}$  fue de 0.650, es decir también resultó un valor muy alto (Tabla N°12).

**Tabla N° 12.** Análisis de Varianza molecular (AMOVA), estadístico F y estadístico R calculado por el programa GenAIEX.

Fuentes de variación	d.f.	SSD	Componentes de varianza	Varianza estimada	Porcentaje de varianza (%)
<b>Entre poblaciones</b>	3	10141.728	3380.576	81.310	65
<b>Entre individuos</b>	80	6022.064	75.276	31.534	25
<b>Dentro de los individuos</b>	84	1025.519	12.209	12.209	10
<b>Total</b>	167	17189.311		125.052	100
<b>R-Statistics</b>					
<b>Rst</b>	0.650				
<b>Ris</b>	0.721				
<b>Rit</b>	0.902				
<b>F-Statistics</b>					
<b>Fst</b>	0.426				
<b>Fis</b>	0.776				
<b>Fit</b>	0.872				

d.f.= degree of freedom, SSD= sum of squares,  $F_{ST}$  y  $R_{ST}$  con P-value = 0.001



**Figura N° 14.** Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) para la población Cachi-Yanacancha, Huáscar-Yanacancha, Choconchaca y Pachapaqui.

#### 4.1.5.2. Coeficiente de endogamia ( $F_{IS}$ )

Los resultados que se obtuvieron del coeficiente de endogamia ( $F_{IS}$ ) para los locus Puya-002, Puya-009, Puya-039, Puya-065, Puya-012, Puya-069, Puya-067, Puya-016, Puya-052 y Puya-037 mostraron valores positivos y altos para cada población de estudio (Tabla N°13); mientras que el locus Puya-046 resultó un valor negativo y bajo, sólo para el sector Cachi de la población de Yanacancha; del mismo modo el locus Puya-049 mostró valores bajos y negativos para las poblaciones de Choconchaca y Pachapaqui, para ambos indicarían exceso de heterocigotos. Al analizar con el  $F_{IS}$  total descrita en la Tabla N° 13 muestra un valor alto, indicando la posibilidad de endogamia.

**Tabla N° 13.** Estimación del coeficiente de endogamia ( $F_{IS}$ ) total, por localidad y para cada locus

LOCUS	Cachi- Yanacancha	Huáscar- Yanacancha	Choconchaca	Pachapaqui	Total
<b>Puya-002</b>	0.4545	0.6609	0.4534	-	0.5098
<b>Puya-009</b>	-	1	-	-	1
<b>Puya-039</b>	1	1	1	-	1
<b>Puya-065</b>	-	0.7347	0.7313	-	0.7324
<b>Puya-012</b>	0.8571	1	0.2803	0.8860	0.7428
<b>Puya-046</b>	-0.0000	0.7759	1	-	0.808
<b>Puya-049</b>	1	0.7833	-0.2683	-0.0000	0.1042
<b>Puya-069</b>	-	1	1	1	1
<b>Puya-042</b>	1	1	1	-	1
<b>Puya-016</b>	-	-	1	1	1
<b>Puya-052</b>	-	-	1	1	1
<b>Puya-037</b>	1	1	1	-	1

#### 4.1.5.3. Análisis de asignación a grupos

El análisis en la asignación de grupos se realizó primero con una aproximación frecuentista; es decir se comparó frecuencias con el objetivo de determinar la posible existencia de estructura poblacional y conocer qué localidad es genéticamente distinta en temas de frecuencias alélicas con otros sitios, con el programa Genetix se calculó los  $F_{IS}$  para los lugares de estudio, obteniendo valores de  $F_{IS}$  igual 0.82095, 0.8738, 0.64269, 0.88646 respectivamente para cada localidad (Tabla N°14), todos los valores resultaron positivos, indicando que existe menos heterocigotos de los que se esperaría; es decir déficit de heterocigotos. Así mismo, se realizó un gráfico en 3D para visualizar la estructura genética sobre las localidades (Figura N° 15).



En la Figura N° 15 se visualiza la diversidad genética en el espacio multivariado; dónde se muestra la existencia de dos grupos, el primer grupo conformado por el sector Cachi-Yanacancha, Huáscar-Yanacancha y Pachapaqui; y como segundo grupo se encuentra la localidad de Choconchaca; además se puede observar que existe algún grado de estructuración genética. Por otro lado, el cálculo de  $F_{ST}$  resultó 0.4813, un valor muy alto, dónde se consideró como hipótesis nula ( $H_0: F_{ST}=0$ ) y de acuerdo a nuestro resultado, rechazamos la hipótesis nula de que las cuatro localidades fueron sacadas de una unidad panmítica; es decir de acuerdo a nuestros resultados obtenidos existe estructura genética.

También se realizó un análisis de varianza molecular (AMOVA) para determinar si existe diferenciación genética en los grupos, resultando un 19.02 % de variación entre los grupos; mientras que entre las localidades dentro de los grupos resultó con un porcentaje de variación de 31.48 %, seguida del 49.50 % de variación dentro de las localidades; para éstos dos resultados no existe un alta diferencia entre ellos; por lo que la diferenciación genética de las localidades dentro de los grupos es moderada (Tabla N° 15).

**Tabla N° 15.** Análisis de Varianza molecular (AMOVA), estadístico  $F_{ST}$ ,  $F_{SC}$  y  $F_{CT}$  calculado por el programa Arlequin.

Fuente de variación	d.f.	Suma de cuadrados	Varianza	Porcentaje de variación
Entre grupos	1	68.899	0.42600 $V_a$	19.02%
Entre localidades dentro grupos	2	52.237	0.70521 $V_b$	31.48%
Dentro de localidades	164	181.817	1.10864 $V_c$	49.50%
Total	167	302.952	2.23984	
$F_{ST}$	0.50504			
P-value	0.00000+-0.00000			
$F_{SC}$	0.38879			
P-value	0.00000+-0.00000			
$F_{CT}$	0.19019			
P-value	0.25513+-0.01382			

d.f.= degree of freedom

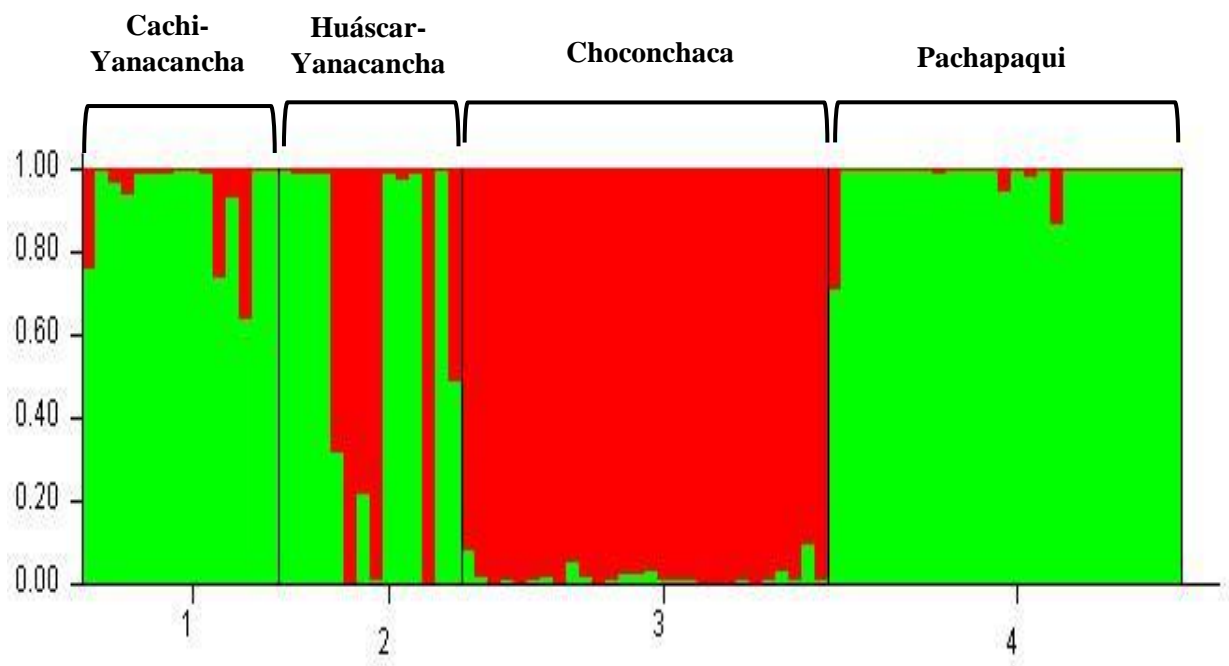
Al analizar la significancia del índice  $F_{ST}$  resultó muy significativo, representando la diferenciación que existe entre todas las localidades de estudio, el índice  $F_{SC}$  también resultó significativo, representando que existe diferenciación de las localidades dentro de cada grupo y finalmente el índice  $F_{CT}$  no resultó significativo con un P-value igual a 0.25513; es decir que no existe diferenciación entre el grupo 1 y grupo 2.

El segundo análisis de asignación a grupos se realizó por probabilidades bayesianas, considerada otro tipo de aproximación, analizada con el programa STRUCTURE, que toma como criterios para la agrupación la maximizar del EHW y minimizar el desequilibrio por ligamiento a todos los genotipos. Para el análisis se consideró que el número de poblaciones asumidas (K) varió de 1 a 10, resultando que cuando  $K=2$  se forman dos grupos genéticos o dos poblaciones genéticamente diferenciadas, el primer grupo o población genética se encuentra conformado por las localidades de Cachi-Yanacancha, Huáscar-Yanacancha y Pachapaqui; por otro lado, la segunda población genética diferenciada se encuentra conformada por la localidad de Choconchaca. También se observó que para la segunda población genética presentó algunos individuos mezclados (Figura N° 16 y Figura N° 17).

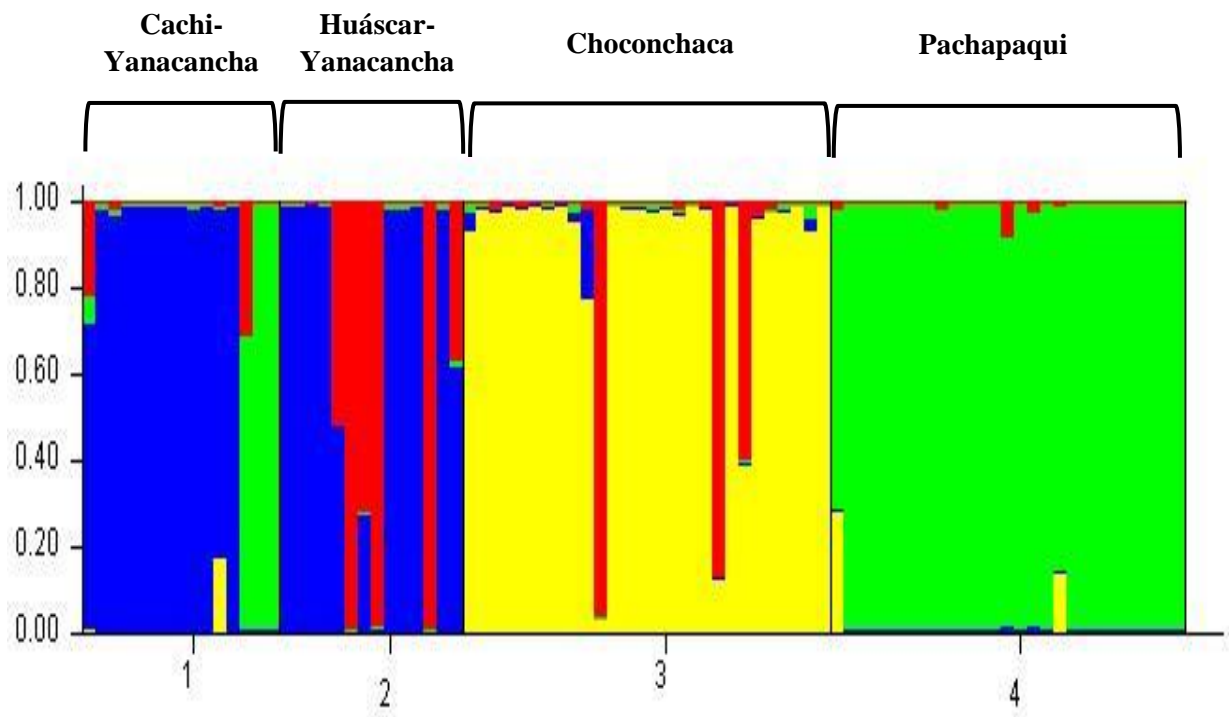
Cuando  $K=4$ , se forman tres grupos principales de coloración amarilla, azul y verde que corresponden a las localidades de Cachi-Yanacancha, Choconchaca y Pachapaqui respectivamente, también se encuentra un cuarto grupo no uniforme de coloración roja que corresponde a la localidad de Huáscar-Yanacancha, también se observó individuos mezclados entre grupo de la localidad de Pachapaqui y la localidad de Cachi-Yanacancha, para los demás valores de K, no se observaron agrupamientos lógicos (Figura N° 16 y Figura N° 17).

Finalmente con el análisis con STRUCTURE HARVERSTER que es una extensión del programa STRCUTURE, resultó que el mayor valor para el Delta K es igual a dos, los demás valores muestran Delta K bajos, tal como se observan en la Tabla N°15 y Figura N°18, con éste análisis indica que el mejor valor para K es igual a dos; es decir existe la probabilidad que haya dos grupos genéticos o dos poblaciones genéticamente diferenciadas.

**K=2**



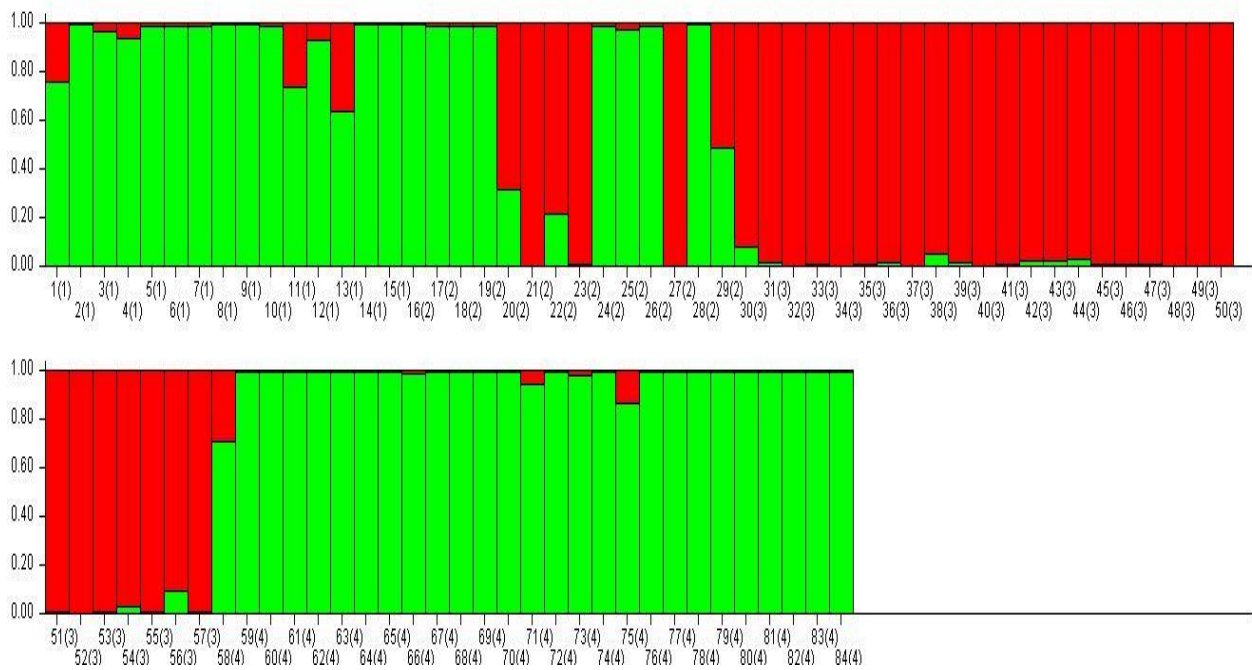
**K=4**



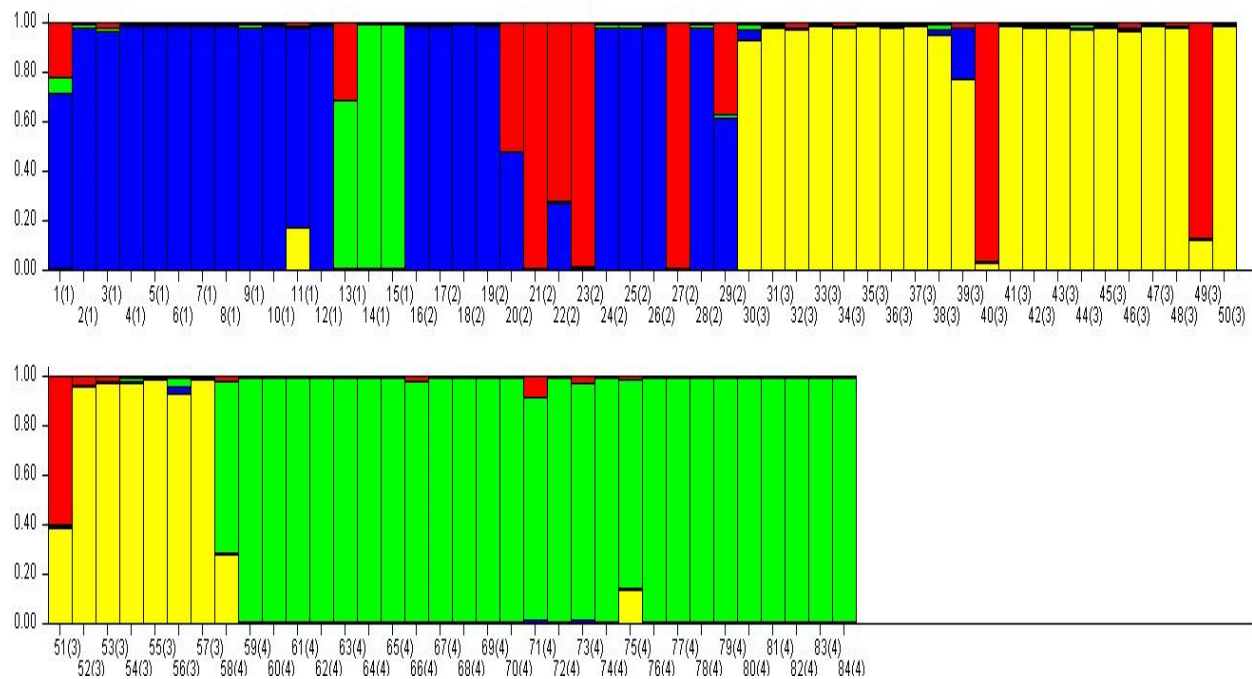
**Figura N° 16.** Análisis de estructuración por agrupamiento de las poblaciones, asumiendo K=2 y K=4



## K=2



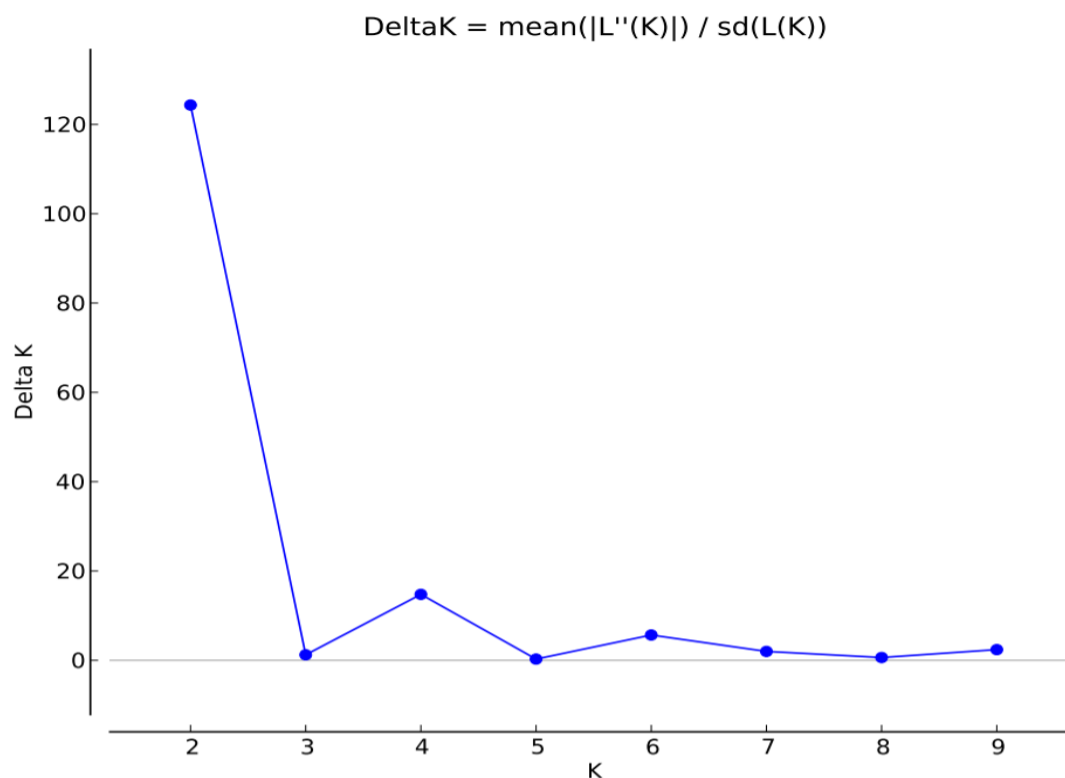
## K=4



**Figura N° 17.** Análisis de estructuración por agrupamiento de las poblaciones en línea para los 84 individuos, asumiendo K=2 y K=4

**Tabla N° 16.** Datos de STRUCTURE HARVESTER para las poblaciones asumidas, resaltando el mejor valor para K

K	Reps	Mean LnP(K)	Stdev LnP(K)	Ln'(K)	Ln''(K)	Delta K
1	4	-1494.525000	0.650000	—	—	—
2	4	-1106.075000	1.813606	388.450000	225.500000	124.337922
3	4	-943.125000	33.828822	162.950000	41.675000	1.231938
4	4	-821.850000	5.470832	121.275000	80.750000	14.760096
5	4	-781.325000	5.914601	40.525000	1.625000	0.274744
6	4	-742.425000	3.641772	38.900000	20.625000	5.663452
7	4	-724.150000	4.043513	18.275000	8.025000	1.984660
8	4	-697.850000	18.937529	26.300000	11.825000	0.624421
9	4	-683.375000	18.878272	14.475000	45.125000	2.390314
10	4	-714.025000	59.432223	-30.650000	—	—



**Figura N° 18.** Gráfico del parámetro Delta K donde muestra el mejor valor para K en la prueba STRUCTURE HARVESTER

## 4.2. Análisis de resultados o discusión de resultados

El estudio sobre diversidad y estructura genética para *Puya raimondii* en las poblaciones de Yanacancha (sector Cachi y sector Huáscar), Choconchaca y Pachapaqui presentó dificultades iniciales; debido a que no se encontraron trabajos anteriores con marcadores microsatélites (SSR); es decir no existían marcadores o cebadores específicos para la especie, por lo que se tuvieron que diseñar previamente marcadores SRR específicos para *Puya raimondii*.

Las localidades de estudio también presentaron diferencias en el estado en que se encontraban, en la localidad de Cachi, Junín se observó que los pobladores cortaban la planta para usarlos dentro de sus actividades, también que habitaba con animales (camélidos) (Anexo N° 6.5) y muchos individuos crecían en lugares rocosos y empinados (Anexo N° 6.5); la localidad de Huáscar, Junín que se encuentra distanciado a sólo 4km de la localidad de Cachi se observó individuos menos impactados, ambas localidades son consideradas dentro de la población de Yanacancha; además cuando se conversó con las personas que vivían en los alrededores donde crecía la planta, sabían el valor y la importancia que tenía la especie. En la población de Pachapaqui, Ancash se observó un estado muy distinto, la especie se encontraba impactada por factores antrópicos, algunos individuos de *Puya raimondii* se encontraban cerca de una carretera que se construyó por actividades humanas (Anexo N°6.5 ), también se observó individuos quemados y cortados (Anexo N°6.5 ) que sumados a los factores de la intensidad radiación solar, fuertes fluctuaciones de temperatura, alta elevación, etc. limitan el establecimiento de las semillas (Miller & Silander, 1991).

Finalmente, la población de Choconchaca que representa la parte Sur en la distribución de *Puya raimondii*, dónde se encontraron los morfotipos descritos por Vadillo (2011), se encontraba parte del territorio de una hacienda, pero no hubo problema con el ingreso, los habitantes de los lugares aledaños habitan con la planta desde hace muchos años según la información de un poblador, también fue muy interesante encontrar que los individuos de *Puya raimondii* cohabitan con una especie de "queñual" (*Polylepis* sp) (Anexo N°6.5), aspecto muy relevante para aspectos ecológicos, los pobladores también queman a la planta por miedo a perder a sus ovejas que se alimentan cerca a las Puyas. Cabe resaltar que en todas las localidades de estudio facilitaron la colecta de muestras, teniendo previamente los permisos de colecta.

#### 4.2.1. Extracción de DNA

*Puya raimondii*, especie que se encuentra amenazada por factores antrópicos, al momento de realizar las colectas de hojas se quiso tener menos impacto posible, por ende se estableció un tamaño de aproximadamente 1.50m para no afectar el crecimiento de las plántulas (menor de 50cm), se escogieron hojas internas por dos razones, la primera razón para facilitarnos en el proceso de la extracción de DNA, porque con las hojas muy duras no se obtuvieron buenas calidades de DNA, resultados que coinciden con otro género de la misma familia (Schulte et al., 2010); ésta característica podría explicarse por interferencia en la extracción de DNA por compuestos que la planta produce para resistir las condiciones ambientales extremas (Porebski, Bailey, & Baum 1997) y porque al momento de las colectas se escogieron hojas de individuos sexualmente maduros que pudieron haber sido demasiado viejos con contenido de DNA mínimo (Murray 1980); para evitar ello se colectaron hojas tiernas, por ende se obtuvieron mejores resultados, los mismos que fueron observados en los geles de agarosa, obteniendo geles más claros cuando se trabajó con partes más tiernas de la hoja.

La segunda razón porque no quisimos hacer impacto en la planta porque se observó que tiene visitantes de aves que posan en las hojas externas. Existen estudios donde también se trabajó con hojas (Hornung-Leoni, Sosa, Simpson, & Gil, 2013) y otros dos estudios dónde se utilizó hojas y semillas para la extracción de DNA para *P. raimondii* (Sgorbati et al., 2004) y *Puya hamata* dónde también se utilizaron 74 individuos y 187 individuos aislado de hojas y semillas respectivamente resultando una baja calidad de DNA de las hojas comparado con el aislado de semillas que resultaron con mejor calidad (Rivadeneira G. 2016).

#### 4.2.2. Diseño de marcadores microsatélites (SSR)

El diseño de microsatélites específico para *Puya raimondii* permitió evitar la transferibilidad de microsatélites de una especie a otra; ya que también es una forma de poder analizar la variabilidad genética; si bien es cierto hay un gran uso de marcadores moleculares ampliamente usado para la familia Bromeliaceae (Hmeljevski et al., 2013) (Zanella et al., 2012), por ejemplo al género Ananas ha sido extensamente usado los marcadores SSR (Rodríguez, Grajal-Martín et al., 2013), por ende los marcadores SSR presenta ventajas, primero porque son muy abundantes y polimórficos, heredados de forma dominante, analíticamente simple y fácil transferibles (Weber, 1990) que han sido ampliamente utilizados en estudios genómicos de plantas (He et al., 2003; Zhang et al., 2018). De acuerdo con Rivadeneira G. (2016) para el género *Puya* no se han aislado microsatélites y que dentro de su estudio se transfirieron exitosamente marcadores microsatélites para *Puya hamata*; por

lo que desarrollar marcadores microsatélites específicos para *P. raimondii* es un resultado exitoso y útil para futuras investigaciones.

El desarrollo de los microsatélites conllevó usar especies emparentadas como *P. hutchinsonii* y *P. macrura*, dónde esta última fue registrada dentro de un estudio filogenético que agrupa a *P. raimondii* dentro de los Andes Centrales y nos resalta la importancia de cómo y dónde ha ido evolucionando el género y relacionarlo con su alta diversificación del hábitat (Rachel Schmidt Jabaily & Sytsma, 2010); para *P. hutchinsonii* se tiene un mayor número de lecturas en las secuencias. De los 220 marcadores SSR identificados se seleccionaron 70 marcadores SSR con un mayor porcentaje de dos nucleótidos y un bajo porcentaje de seis nucleótidos.

Existen estudios que demuestran la utilidad del desarrollo y caracterización de marcadores microsatélites en temas de diversidad genética y estructura poblacional como el estudio realizado para el género *Corybas* (Orchidaceae) en el que se desarrolló 22 marcadores SSR (Etten, Pearson, Robertson, & Tate, 2018) o como para la especie endémica *Psammosilene tunicoides* con un total de 21 marcadores SSR y 11 primers polimórficos (Zhang et al., 2018); también para la especie amenazada *Plagiorhegma dubium* dónde se desarrollaron 30 marcadores SSR con 25 primers polimórficos (Kim, Lee, Kim, Kang, & Kim, 2018); así como para *Primula sinolisteri* con 30 marcadores SSR, dónde todos fueron polimórficos (Wang et al., 2019); en estos estudios nos aportan información valiosa para tomar decisiones en temas de conservación.

#### **4.2.3. Parámetros de diversidad genética**

Los doce marcadores SSR polimórficos descritos en el presente estudio presentaron una variación del número alélico total de 2 hasta un máximo de 13, para las localidades la variación resultó de 1 hasta 9; siendo la localidad de Choconchaca y Huáscar los que presentaron mayor número de alelos, a diferencia de las localidades de Cachi y Pachapaqui quienes presentaron menor número de alelos para cada locus reportado. Así mismo, los locus con mayor número de alelos fueron Puya-002, Puya-012 y Puya-046, para el locus Puya-002 que mayor número de alelos registró (13) presentó variación del número de alelos por cada localidad de estudio, en el sector Cachi resultó con 5 alelos, el sector Huáscar resultó con 6 alelos, la localidad de Choconchaca con 9 y finalmente la localidad de Pachapaqui con 1; notándose la tendencia que la localidad de Choconchaca supera a las demás poblaciones en diversidad alélica, éste tipo de tendencia se observa en cierto tipo de marcadores o en la alta tasa de mutación de los microsatélites (Oliveira et al. 2006) así como en las diferencias reportadas para cada localidad.

Los alelos en común para todas las poblaciones fueron 26, siendo 21 las presentaron alta frecuencia; por otro lado los alelos exclusivos fueron 3 para el sector de Cachi, 11 alelos para el sector de Huáscar, 15 alelos para la localidad de Choconchaca y 4 alelos para la localidad de Pachapaqui; demostrando una vez más que la población de Choconchaca tendría mayor diversidad alélica que el resto de las localidades, de estos alelos exclusivos aproximadamente la mitad resultaron con frecuencia bajas. Según Hale et al. (2012) los alelos raros (AR) que presentan frecuencias  $< 0.05$  son comunes de encontrar en estudios con microsatélites; pero, los alelos muy raros (AmR) con frecuencias  $< 0.01$  casi no brindan información útil para la mayoría de los análisis poblacionales, ya que su presencia puede deberse meramente a mutaciones recurrentes y no a factores históricos o flujo génico.

En nuestro estudio, el sector de Cachi presentó 2 AR, el sector de Huáscar 1 AR y 1 AmR, la localidad de Choconchaca presentó 8 AR y finalmente la localidad de Pachapaqui 4 AR; es decir que la localidad de Choconchaca presentó un mayor número de AR y de los 4 alelos exclusivos para la localidad de Pachapaqui todos resultaron ser AR; por lo que es importante mencionar según Acuña (2016) que la condición de estos alelos se debe principalmente a la alta tasa de mutación de los microsatélites, la cual es responsable del cambio en el número, frecuencia y hasta en la aparición de nuevos alelos; lo cual es característico en la mayoría de los alelos exclusivos para las localidades de Cachi, Choconchaca y Pachapaqui. Si bien muchos de estos alelos exclusivos no son útiles para los análisis poblaciones (He y FST), si pueden llegar a ser útiles en los programas de mejoramiento y conservación de la especie (Acuña, 2016) que es tema relevante para el estudio.

Otro parámetro sobre la diversidad genética que resulta ser un buen índice de evaluación del polimorfismo del marcador SSR es el índice de contenido polimórfico (PIC). Según Botstein et al. (1980) cuando  $PIC > 0.5$ , el locus tiene alta diversidad; cuando el PIC se encuentre entre 0.5 y 0.25, el locus tiene una diversidad intermedia (razonablemente informativo) y cuando el  $PIC < 0.25$  el locus tiene baja diversidad (ligeramente informativo); para nuestro estudio de los 12 marcadores SSR, 2 locus resultaron con alta diversidad (Puya-002 y Puya-049), mientras 6 locus resultaron tener diversidad intermedia (Puya-002, Puya-039, Puya-042, Puya-016, Puya-052 y Puya-037) y 4 locus presentaron tener locus con baja diversidad (Puya-009, Puya-065, Puya-046 y Puya-069); en nuestro estudio no se encontraron loci con  $PIC = 0$ ; es decir todos los loci aportan información en el análisis de la diversidad genética poblacional.

Dentro de los niveles de heterocigosidad de las poblaciones, la  $H_o$  varió de 0 hasta 0.929 para el locus Puya-049; mientras que la  $H_e$  varió de 0 hasta 0.723 también para el mismo locus (Puya-049), el resultado promedio de la  $H_o$  fue 0.051, valor menor comparado con el resultado promedio de la  $H_e$  que fue de 0.217, en este caso cuando la  $H_o$  es menor a la  $H_e$  según Toro et al. (2011) se sospecha

que el exceso de homocigosidad sea a causa de la endogamia en la población; sin embargo es importante el análisis por cada localidad de estudio, se observó también que la heterocigosidad total fue de 0.217, valor que no pudo ser comparado con otras poblaciones de *P. raimondii*; ya que no se pudo encontrar algún trabajo que se haya realizado con los mismos tipos marcadores SSR descritos para la especie en estudio; se tiene los estudios realizados para el género *Corybas* con rangos de heterocigosidad observada y esperada de 0-1 y 0-0.859 respectivamente (Etten et al., 2018) y para la especie *Psammosilene tunicoides* con rango de 0-1 para la heterocigosidad observada y 0-0.615 para la heterocigosidad esperada (Zhang et al., 2018); así como también para la especie *Plagiorhegma dubium* dónde se obtuvo rangos de heterocigosidad esperada de 0-0.594, 0-1 y 0-0.744 para tres poblaciones en estudio (Kim et al., 2018). Además es posible tomar como referencia los valores obtenidos de las especies relacionadas con las especies de *Puya* que se utilizaron para el desarrollo de los marcadores SSR para *P. raimondii*, los valores de  $H_e$  total que presentaron fue igual a 0.4026, 0.4002 y 0.1905 para *P. macrura*, *P. macropoda* y *P. hutchisonii* respectivamente; dichos valores no se encuentran muy alejados de los que se encontraron en el estudio; por lo que se estaría pensando que las localidades estudiadas cuentan con una diversidad genética moderada a alta, pero se tendría que tener cuidado en interpretar o generalizar la diversidad genética para todas las localidades.

El análisis por localidad de estudio presentó diferencias de la  $H_e$  promedio, en el sector de Cachi resultó igual a 0.153, para el sector de Huáscar igual a 0.318, para la población de Choconchaca igual a 0.344 y finalmente la población de Pachapaqui igual a 0.052; de acuerdo a estos resultados, la población de Choconchaca presenta una mayor diversidad genética que las demás poblaciones; por otro lado también se observó que el sector de Huáscar presenta mayor diversidad genética comparado con el sector de Cachi, sabiendo que ambos pertenecen a una misma población de Yanacancha, Junín. Los valores de  $H_e$  reportados para las localidades de Choconchaca y Huáscar se encuentran en el rango de los valores que se reportaron para las especies de *Puya* (*P. macrura*, *P. macropoda* y *P. hutchisonii*); a diferencia de las localidades de Cachi y Pachapaqui que presentaron valores bajos, esta pérdida de diversidad genética estaría siendo provocada por los impactos en el ecosistema donde habita la especie; tal como se describió en la localidad de Pachapaqui, se observó destrucción del hábitat por factores antrópicos ( construcción de carreteras) o producto de la quema, impidiendo la llegada de polinizadores, desarrollo de flora acompañante, etc.; un caso muy distinto fue la localidad de Choconchaca que presenta mayor diversidad genética, en dónde encontró dentro de un hacienda, un lugar con menor impacto, observándose otro tipo de vegetación como *Polylepis* sp, también presencia de aves, roedores, etc.; por lo tanto es un buen ejemplo para repensar la importancia de conservar no sólo a la especie en sí, sino a todo el ecosistema dónde habita, ésta idea se refuerza por la Teoría de los ecosistemas, según Jorgensen (2004) no existen organismos aislados sino conectados

con otros, la unidad mínima teórica para cualquier ecosistema son dos poblaciones, una de las cuales fija energía y la otra descompone y recicla los residuos, pero en la realidad los ecosistemas viables son redes complejas de poblaciones que interactúan entre sí.

Los resultados obtenidos coinciden en términos de variación genética dentro de una Área Natural Protegida (Parque Nacional Huascarán-PNH) y áreas vecinas (Canchayllo); si bien es cierto se usó otro tipo de marcador (AFLP) se encontró que los individuos del PNH tienen altos niveles de polimorfismo que los individuos de Canchayllo, resaltando la importancia de las Áreas de Conservación; también se indicó que la variación genética está presente en las poblaciones de *P. raimondii* en el Perú (Hornung-Leoni et al., 2013); las que difieren del estudio realizado por Sgorbati et al (2004) que reportó poblaciones monomórficas con 98.3% de similaridad genética con un total de diversidad genética ( $H_t$ ) de 0.02951 y un valor más bajo de diversidad promedio dentro de las poblaciones las 8 que evaluó ( $H_s=0.0114$ ); la diferencia de los resultados que se obtuvieron en el presente trabajo es posible explicarlo porque se exploraron diferentes localidades; así como el tipo de marcador y la especificidad del mismo, finalmente porque se colectaron individuos de similar tamaño y estado.

La prueba de EHW mostró que la mayoría de los loci evaluados presentaron desviación significativa, es decir mostraron estar en desequilibrio de HW considerando un  $P\text{-value}<0.05$ , el sector de Cachi presentó 6 loci (Puya-002, Puya-039, Puya-012, Puya-049, Puya-042 y Puya-037) que no se encuentran en equilibrio HW, para el sector de Huáscar resultaron 10 loci (Puya-002, Puya-009, Puya-039, Puya-065, Puya-012, Puya-046, Puya-049, Puya-069, Puya-042 y Puya-037), para la población de Choconchaca resultaron 9 loci (Puya-002, Puya-039, Puya-065, Puya-046, Puya-069, Puya-042, Puya-016, Puya-052 y Puya-037) y por último la población de Pachapaqui resultaron 4 loci (Puya-012, Puya-069, Puya-016 y Puya-052); por lo que el sector de Huáscar y población de Choconchaca presentaron mayor número de loci que no están en equilibrio de HW, asociada a la deficiencia de heterocigotos (exceso de homocigosidad) que por fuerzas evolutivas, endogamia e historia de vida de la especie podrían estar provocando el incumplimiento de los supuestos del EHW; para ésta última localidad descrita se reportaron dos loci sin desviación de EHW (Puya-012 y Puya-049). Además nuevamente los resultados que se obtuvieron de heterocigosidad se correlacionan con los obtenidos con la prueba de EHW, demostrando que la localidad de Choconchaca y Huáscar tienen diferencias en términos de variabilidad genética; y que la localidad de Pachapaqui muestra la tendencia a la pérdida de su variabilidad genética, a casusa de los factores mencionados y porque los niveles de variabilidad genética en una población pueden ser erosionados cuando las poblaciones disminuyen



drásticamente de tamaño y/o son aisladas de otras poblaciones, como cuando hay destrucción y fragmentación de su hábitat (López-Gallego, 2015); así como la falta de estrategias de conservación.

#### 4.2.4. Análisis de estructura poblacional

La prueba de AMOVA mostró una alta diferenciación genética entre las poblaciones (localidades) con un 65% de diferenciación; a ello se suma los valores obtenidos de  $F_{ST}$  (0.426) y  $R_{ST}$  (0.650), al analizar el valor de  $F_{ST}$  que es un valor total obtenido del análisis para todas las localidades, se muestra una diferenciación genética alta entre las poblaciones, resultado que podría explicarse por las variaciones morfológicas (morfortipos) del Norte y Sur del País que se encontraron (Vadillo, 2011) que responde a nuestra pregunta de investigación; también por la separación geográfica entre las localidades; y porque los polinizadores mayormente colibríes no son tan específicos para *P. raimondii*, se tiene un registro para el género *Puya* que las flores proveen de néctar para los colibrís y son fuente de alimento para los ojos de anteojos (Jabaily y Sytsma 2013). Para *Puya raimondii* se encontró mayor volumen y concentración de azúcar, específicamente un alto porcentaje de glucosa (85.94 %) (Hornung-leoni et al. 2013); también está el estudio sobre aspectos reproductivos y de polinización realizado por Salinas (2006); dónde encontró que las especies alto andinas de la familia Trochilidae (“picaflores”) (Schuchmann, 1999) tienen como importante recurso el néctar de las flores de *Puya raimondii*, se ha reportado con mayor frecuencia a *Patagona gigas* (1) como principal polinizador, seguido de *Colibrí coruscan* ( 0.25) y *Oreotrochillus leucopleurus* (0.15), también a *Phrygilus punensis* (1) como principal roedor de néctar; por lo que los picaflores altoandinos cumplen un rol de transportadores de los granos de polen que permiten entender el flujo genético entre las localidades; otro aspecto relacionado con el flujo genético es la altitud que va de la mano con el comportamiento de los colibríes, estudios han informado que los colibrís evitan cambiar su gradiente altitudinal de alimentación (Salinas et al., 2007), estos permanecen con el polen en el mismo nivel altitudinal durante el forrajeo (Carpenter 1978). Y finalmente otro aspecto menos estudiado que también podría influir en el flujo génico son la forma de las semillas, si bien es cierto son muchas las semillas que se dispersan por su forma alada y se transportan fácilmente por el viento (observación personal); aún se desconoce si la dirección del viento y la velocidad podrían alcanzar distancias geográficas entre las localidades.

Por otro lado, se tiene el análisis del valor de  $R_{ST}$  que muestra un valor que se aleja mucho al cero (panmixia), indicando una alta diferenciación genética entre las localidades; éste estadístico ( $R_{ST}$ ) se usa con la con la finalidad de reforzar o refutar el valor del  $F_{ST}$ , debido a su capacidad de rechazar la alta y compleja tasa de mutación que caracteriza a los microsatélites y por tanto evitar la

sobreestimación del grado de diferenciación genética por homoplasia (Balloux y Lugon 2002, Estoup et al. 2002, Hardy et al. 2003). Nuestros resultados coinciden con el estudio realizado en *Bromelia antiacantha*, especie poliploide, dónde se reportó un alto de coeficiente de endogamia ( $F_{IS}=0.431$ ), indicando exceso de homocigotes y un alto nivel de diferenciación genética ( $F_{ST}=0.224$ ); también se encontró una alta estructuración genética en las poblaciones que se relacionaron con la alta variación morfológica; por ende llegaron a la conclusión que son cuestiones que deben considerarse para temas de conservación (Zanella et al., 2011).

El coeficiente de endogamia ( $F_{IS}$ ) calculado para cada locus, fue analizado por localidad; encontrando que para el sector de Cachi, sector Huáscar, localidad de Choconchaca y localidad de Pachapaqui tuvieron 6 locus, 10 locus, 10 locus y 4 locus respectivamente con valores altos y positivos que significa deficiencia de heterocigotos y la presencia de endogamia; sin embargo se encontraron también valores negativos que indican un exceso de heterocigotos; aunque el número de locus fue menor para las localidades descritas respectivamente 1 locus (Puya-046), 0 locus, 1 locus (Puya-049) y 1 locus (Puya-049).

El análisis de estructuración genética entre las localidades se realizó primero con una aproximación frecuentista, dónde al comparar las frecuencias alélicas se determinó dos grupos genéticamente distintos en un espacio multivariado, el primer grupo corresponde a las poblaciones de Yanacancha (sector Cachi y sector Huáscar) y Pachapaqui y el segundo grupo corresponde sólo a la población de Choconchaca; es decir mediante esta prueba se encontró estructuración genética poblacional; reforzando a ello se suma el valor de  $F_{ST}$  (0.4813) dónde se rechaza la idea que las localidades fueron sacadas de una unidad panmítica y que existe una diferenciación genética entre las localidades. Además, se realizó un AMOVA entre los grupos, resultando un porcentaje de variación moderada (19.02 %), mientras que el porcentaje de variación de las localidades entre los grupos resultó un valor mayor (31.48 %) que coincide con el P-value (0.00000) significativo para el  $F_{SC}$ ; sin embargo el P-value del  $F_{CT}$  (0.25513) no resultó significativo, indicando que no existe diferenciación entre el grupo 1 y grupo 2, puede deberse porque al analizar qué localidad es genéticamente distinta en temas de frecuencias alélicas con las demás localidades se necesita muchos individuos para el análisis, para ello tendríamos que realizar más muestreo destructivo, pero el gráfico multivariado nos muestra que si existe algún grado de estructuración genética. Otro punto importante para entender los resultados es conocer la historia de vida de la especie, *P. raimondii* es considerada una especie semelpara y que de acuerdo a la evolución se explica bajo dos modelos, el modelo del esfuerzo reproductivo y el modelo demográfico, el primero compara en términos de recompensa e inversión el número de

polinizadores y el número de flores; el segundo modelo explica de acuerdo al hábitat donde los climas son duros y una reproducción futura es menos probable (Rachel S. Jabaily & Sytsma, 2013).

Finalmente, se realizó otro análisis para complementar la estructuración genética entre las poblaciones con el programa STRUCTURE (Pritchard et al. 2000, Pritchard et al. 2010). Los clusters (K) variaron de 1 a 10; pero el valor de K=2 mostró tener mayor concordancia con los análisis descritos anteriormente (Análisis multivariado, AMOVA y  $F_{ST}$ ); por lo que se vuelve a corroborar la existencia de dos grupos o poblaciones genéticas del norte y sur que tienen separación geográfica y se complementan con los estudios sobre la diversidad genética y morfológica que se realizaron en catorce poblaciones ubicadas en el norte, centro y sur del país, encontrando la existencia de variabilidad morfológica significativa en el número de espinas, porcentaje de espinas orientadas hacia fuera y el porcentaje de ápice sin espina, pero se propuso realizar más evaluaciones con marcadores moleculares porque se asumió baja variabilidad genética (Vadillo et al., 2007). La estructuración encontrada en el estudio podría explicarse también por el estado en que se encuentran los individuos y el hábitat de *P. raimondii*, factores importantes para encontrar una marcada diferenciación genética en las localidades. Nuestros resultados coinciden con un estudio realizado para *Pitcairnia flammea* (Bromeliaceae) en tres poblaciones naturales con otro tipo de marcadores (ISSR) donde se encontró la existencia de dos grupos genéticos (K=2) con una diferenciación genética moderada de 0.0974 en las poblaciones (Domingues et al., 2011).

Además, mediante el método de Evanno se corroboraron los valores de probabilidad obtenidos en la prueba de estructuración, siendo el valor de K=2 el número ideal de poblaciones; es decir población Choconchaca se diferencia genéticamente de la población Yanacancha (sector Cachi y sector Huáscar) y población de Pacahapaqui; por ende los resultados de esta investigación tienen base científica para la conservación de la especie de *P. raimondii* y la importancia de conservar también el hábitat, si bien es cierto que nuestros resultados no coinciden con el estudio realizado por Sgorbati et al. (2004), donde analizaron la diversidad genética de 8 poblaciones de *P. raimondii*, los diferentes resultados podrían ser por el tipo de marcador molecular trabajado; para el presente estudio se diseñaron marcadores moleculares microsatélites (SRR) propios de la especie. Además, por el tamaño de los individuos para el muestreo foliar, el promedio de los individuos que se trabajó en el presente estudio fue 1.50 m, individuos juveniles (Salazar Castillo y Villasante Benavides 2012); y para el estudio de Sgorbati (2004) se analizaron semillas y no se especifica el tamaño de los individuos para el muestreo foliar; y finalmente porque las poblaciones de Pacahapaqui, Yanacancha y Choconchaca no figuran en los lugares de estudio de Sgorbati (2004); es decir se exploraron diferentes localidades.

Por tanto es muy importante tomar acciones de conservación en la región Sur del País, se tiene un precedente en Ayacucho para la creación del Área de Conservación Regional Titankayoc donde incluye aspectos sociales, ambientales y estudios de investigación científica para educar y sensibilizar en las comunidades locales en la conservación (Rozzi y Nazionale 2015). Por lo que la presente investigación podría aportar para la creación de un área de conservación regional en Puno y que de acuerdo a la propuesta por Vadillo, Suni & Roca (2007) para un plan de conservación y manejo de *P. raimondii* se debe realizar evaluaciones poblacionales mediante marcadores moleculares; a fin de conocer la estructura poblacional y las áreas de mayor diversidad que ayudarán a determinar futuros centros de conservación; ya que hasta la actualidad no existe un Área Natural Protegida formal registrada por SERNANP en la región Sur que conserve el acervo genético de *Puya raimondii* en las poblaciones de la región sur de País por tanto nuestros resultados son base importante y útil para generar planes de conservación para *Puya raimondii* en el Perú.

## CONCLUSIONES

- ❖ Los marcadores microsatélites específicos para *Puya raimondii*: Puya-002, Puya-009, Puya-065, Puya-039, Puya-012, Puya-046, Puya-049, Puya-069, Puya-042, Puya-016, Puya-052 y Puya-037 mostraron alta información polimórfica que aportan información útil para estudios de diversidad y estructura genética que podrían utilizarse por transferibilidad para otras especies relacionadas con *P. raimondii*.
- ❖ Las poblaciones de *Puya raimondii* presentaron una diversidad genética moderada – alta, siendo la población de Choconchaca (Puno) la que presentó mayor diversidad genética, la misma donde se observó menor impacto y con otro tipo de vegetación (árboles de queñual); a diferencia de la población de Pachapaqui (Ancash) muestra la tendencia a la pérdida de su variabilidad genética, la misma donde se observó mayor impacto en su hábitat.
- ❖ Las poblaciones muestran una alta estructuración genética, determinándose dos grupos genéticamente distintos el primer grupo corresponde a las poblaciones de Yanacancha (sector Cachi y sector Huáscar) y Pachapaqui; y el segundo grupo corresponde a la población de Choconchaca que coinciden las diferencias en los morfotipos del Norte y Sur del País.
- ❖ La población de Choconchaca mostró valores más bajos grados de endogamia, debido a encontrarse dentro de un área poco accesible (hacienda).
- ❖ La población de Choconchaca por presentar mayor diversidad y estructura genética, aporta información útil para la creación de un área de conservación en el departamento de Puno o programas de conservación en el sur del País.

## RECOMENDACIONES

- Comparar las poblaciones de *Puya raimondii* que se encuentran dentro de las Áreas Naturales Protegidas, establecidas por SERNANP, con las poblaciones que no se encuentran dentro de éstas áreas para determinar qué exactamente se está conservando.
- Evaluar mayor número de poblaciones de *Puya raimondii* en el Sur del Perú, en los departamentos de Puno y Moquegua, para encontrar cómo se encuentran los niveles de diversidad y estructura genética dentro de cada departamento.
- Trabajar con poblaciones reportadas en Bolivia para determinar cuál es el grado de variabilidad genética de esas poblaciones y comparar con las reportadas en Perú para establecer un Plan Macro de Conservación de *Puya raimondii*.
- Estudiar los factores físicos y biológicos del hábitat, así como la relación con otros organismos que tienen similar distribución para correlacionarlos con las poblaciones genéticamente distintas.
- Realizar un estudio de Filogeográfico para todas las poblaciones de Perú y Bolivia; con el fin de conocer los procesos históricos y evolutivos de la especie.
- Mayor divulgación de los estudios de investigación a los lugares donde habita *Puya raimondii* para promover mayor actores en la conservación.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acuña, W. (2016). Determinación de la diversidad genética y estructura genética de patos criollos (*Cairina moschata* L. 1758) de los departamentos de Lambayeque y San Martín mediante el uso de microsatélites. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Alonso, S., & Darwin, C. (2000). *Genética y Evolución (Darwiniana)*.
- Aranguren J.A., R. Bravo, W. Isea, et al. (2005). Los microsatélites (STR's), marcadores moleculares de ADN por excelencia para programas de conservación: una revisión. *Archivos Latinoamericanos de Producción Animal* 13(1): 30–42.
- Arico, S., Bridgewater, P., El-beltagy, A., Finlayson, M., Harms, E., Program, S., ... Watson, R. T. (2005). Millennium Ecosystem Assessment, 2005. Ecosystems and Human Well-being: Synthesis. Island Press, Washington, DC. In *World Health*. <https://doi.org/10.1196/annals.1439.003>
- Balloux F. & N. Lugon. (2002). The estimation of population differentiation with microsatellite markers. *Molecular Ecology* 11(2): 155–165.
- Bankevich, A., S. Nurk, D. Antipov, A. A. Gurevich, M. Dvorkin, A. S. Kulikov, V. M. Lesin, et al. (2012). SPAdes: A new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *Journal of Computational Biology* 19: 455–477.
- Carpenter, F.L. (1978). A spectrum of nectar-eater communities. *American Zoologist*, 18, 809-819.
- Chapin III, F. Stuart; Zavaleta, Erika S.; Eviner, Valerie T.; Naylor, Rosamond L.; Vitousek, Peter M.; Reynolds, Heather L.; Hooper, David U.; Lavorel, Sandra; Sala, Osvaldo E.; Hobbie, Sarah E.; Mack, Michelle C. & Díaz, S. (2005). Consequences of changing biodiversity. *Miljøministeriet, Skov- Og Naturstyrelsen*, 405(May), 61.
- Domingues, R., Machado, M. A., Forzza, R. C., Melo, T. D., Wohlres-Viana, S., & Viccini, L. F. (2011). Genetic variability of an endangered bromeliaceae species (*Pitcairnia albiflos*) from the Brazilian atlantic rainforest. *Genetics and Molecular Research*, 10(4), 2482–2491. <https://doi.org/10.4238/2011.October.13.5>
- Dorst, B. J. (1956). *IBIS 99 THE P W A STANDS OF THE PERUVIAN HIGH PLATEAUX AS A BIRD HABITAT* .\*. (6).
- Dourojeanni, M.J. & Ponce, C. Los Parques Nacionales del Perú (Madrid, España: Instituto de la Caza Fotográfica (INCAFO), 1978-Colección La Naturaleza en Iberoamérica), p.224
- Doyle, J. J., & Doyle, J. L. (1989). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of from leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, 19(1), 11–15.
- Earl, Dent A. & Vonholt, Bridgett M. (2012). Structure Harvester: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resource* vol. 4 (2) pp. 359-361 doi: 10.1007/s11286-011-9548-7.
- Eguiarte, L.; Aguirre, E.; Sheinvar, E.; Gonzáles, A.; Souza, V. (2010). Flujo génico, diferenciación y estructura genética de las poblaciones, con ejemplos en especies de plantas mexicanas. Universidad Autónoma de México.

- Ellstrand, N. C., & Elam, D. R. (1993). Population Genetic Consequences of Small Population Size: Implications for Plant Conservation. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 24(1), 217–242. <https://doi.org/10.1146/annurev.es.24.110193.001245>.
- Etten, M. L. Van, Pearson, S. M., Robertson, A. W., & Tate, J. A. (2018). *Microsatellite markers for Corybas ( Orchidaceae ) species in New Zealand*. 6(11), 4–8. <https://doi.org/10.1002/aps3.1192>.
- Estoup A., Jarne P. & Cornuet J. (2002). Homoplasmy and mutation model at microsatellite loci and their consequences for population genetics analysis. *Molecular Ecology* 11(9): 1591–604.
- Excoffier, L., & Lischer, H. E. L. (2010). Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*, 10(3), 564–567. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2010.02847.x>.
- Evanno G., Regnaut S. & Goudet J. (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology* 14:2611–2620.
- Fisher R. (1930). *The Genetical Theory of Natural Selection*. Oxford: Oxford University Press. 2nd Rev. ed., New York: Dover.
- Freeland, J. (2005). The evolution of population biology: past, present and future. *Journal of Biogeography*, 32, 2039–2040. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2699.2005.01316.x>.
- Futuyma D.J. (2004). ‘The fruit of the tree of life: insights into evolution and ecology’, in Cracraft, Donoghue M.J. (eds.), 2004, *Assembling the Tree of life*, Oxford and New York: Oxford University Press, 25-39.
- Giménez-Pecchi, M. P.; Bruno C.; Balzarini, M. & L. I. G. (2006). *Aplicación del análisis de la varianza molecular en datos de perfiles electroforéticos de segmentos genómicos del mal de río cuarto virus application of the analysis of molecular variance in electrophoretic profile data of mal de río cuarto virus ( MRCV )*. (December 2015).
- Godefroid, S., Piazza, C., Rossi, G., Buord, S., Stevens, A., Aguraiuja, R., ... Vanderborght, T. (2011). How successful are plant species reintroductions? *Biological Conservation*, 144(2), 672–682. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2010.10.003>.
- Hale M.L., Burg T.M. & Steeves T.E. (2012). Sampling for microsatellite-based population genetic studies: 25 to 30 individuals per population is enough to accurately estimate allele frequencies. *PLoS ONE* 7(9): 45170.
- Hall T.A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/ NT. *Nucleic Acids Symp Ser* 41: 95–98.
- Hall, T. A. 1999. BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95–98.
- Hamilton M.B. (2009). *Population genetics*. Wiley – Blackwell. Capítulo 2
- Hamrick J.L. & Godt M.J. (1989). Allozyme diversity in plant species. En Brown AH, Clegg MT, Kahler AA, Weir BS (Eds.) *Plant Population Genetics, Breeding and Germplasm Resources*. Sinauer. Sunderland, MA, EEUU. pp. 43-63.



- Hardy O.J, Charbonnel N., Fréville H., et al. (2003). Microsatellite allele sizes: a simple test to assess their significance on genetic differentiation. *Genetics* 163(4): 1467– 82.
- Hartl D. (1981). A primer of population genetics. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Massachusetts.  
Hartl D. & A. Clark. 1989. Principles of population genetics. 2<sup>a</sup> Ed. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Massachusetts.
- Hartman, O. (1981). *Puya raimondii* cada vez menos. *Boletín de Lima*, 79–83.
- He, G., Meng, R., Newman, M., Gao, G., Pittman, R. N., & Prakash, C. S. (2003). *Microsatellites as DNA markers in cultivated peanut ( Arachis hypogaea L .)*. 6, 1–6.
- Herrera-paz, E. F. (2013). *La genética de poblaciones y el origen de la diversidad humana*. 81(1), 40–45.
- Hmeljevski, K. V., Ciampi, M. B., Baldauf, C., Sedrez, M., Reis, D., & Forzza, R. C. (2013). Development of SSR Markers for *Encholirium horridum* (Bromeliaceae) and Transferability to Other Pitcairnioideae. *Applications in Plant Sciences*, 4, 1245–1250.
- Hooftman, D. A. P., & Diemer, M. (2002). *Effects of Small Habitat Size and Isolation on the Population Structure of Common Wetland Species*. 4, 720–728.
- Hornung-leoni, C. T., González-gómez, P. L., & Troncoso, A. J. (2013). Acta Oecologica Morphology , nectar characteristics and avian pollinators in five Andean *Puya* species ( Bromeliaceae ). *Acta Oecologica*, 51, 54–61. <https://doi.org/10.1016/j.actao.2013.05.010>.
- Hornung-Leoni, C. T., Sosa, V., Simpson, J., & Gil, K. (2013). Genetic variation in the emblematic *Puya raimondii* (Bromeliaceae) from Huascarán National Park, Peru. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 13(1), 67–74. <https://doi.org/10.1590/S1984-70332013000100008>.
- Howard, M. G., McDonald, W. J. F., Forster, P. I., Kress, W. J., Erickson, D., Faith, D. P., & Shapcott, A. (2016). *Patterns of Phylogenetic Diversity of Subtropical Rainforest of the Great Sandy Region , Australia Indicate Long Term Climatic Refugia*. 1–19. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0153565>.
- Jabaily, Rachel S., & Sytsma, K. J. (2013). Historical biogeography and life-history evolution of Andean *Puya* (Bromeliaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, 171(1), 201–224. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.2012.01307.x>.
- Jabaily, Rachel Schmidt, & Sytsma, K. J. (2010). Phylogenetics of *Puya* (Bromeliaceae): Placement, major lineages, and evolution of Chilean species. *American Journal of Botany*, 97(2), 337–356. <https://doi.org/10.3732/ajb.0900107>.
- Jorgensen, S.E., Fath, B.D. (2004). “Application of thermodynamic principles in ecology”, *Ecological Complexity* I, 267-280.
- Jost L. (2008). GST and its relatives do not measure differentiation. *Mol Ecol*. 17: 4015-4026.
- Kim, B., Lee, S., Kim, Y., Kang, D., & Kim, Y. (2018). *Development and characterization of 30 microsatellite loci for Plagiorhegma dubium ( Berberidaceae )*. 6(12), 1–5. <https://doi.org/10.1002/aps3.1200>.

- Kofler, R., C. Schlotterer, and T. Lelley. (2007). SciRoKo: A new tool for whole genome microsatellite search and investigation. *Bioinformatics* 23(13): 1683–1685.
- Lambe, A. (2009). The IUCN Red List of Threatened Species\_ *Puya raimondii*. *IUCN*, 104, 13–15.
- Li W.H. (1976) A mixed model of mutation for electrophoretic identity of proteins within and between populations. *Genetics* 83:423-432.
- López-Gallego, C. (2015). *Monitoreo de poblaciones de plantas para conservación*.
- Maksylewicz-kaul, R. B. A. (2012). *Genetic diversity of carrot ( Daucus carota L.) cultivars revealed by analysis of SSR loci Genetic diversity of carrot ( Daucus carota L.) cultivars revealed by analysis of SSR loci*. (February). <https://doi.org/10.1007/s10722-011-9777-3>.
- Miller, G. A. & Silander J.R. (1991). Control of the distribution of giant rosette species of *Puya* (Bromeliaceae) in the Ecuadorian páramos. *Biotropica*.23: 124-133.
- Morales M.; Suni M. (2003). Estudio anatómico foliar de *Puya raimondii* Harm (Bromeliaceae). Libro de resúmenes. XII Reunión Científica del Instituto de Investigación de Ciencias Biológicas “Antonio Raimondi” – Facultad de Ciencias Biológicas - UNMSM Lima Perú.
- Morris C. (1992). Academic Press Dictionary of Science and Technology. Academic Press (Ed). San Diego, California.
- Murray M., & Thomson, W. (1980) Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Carnegie Institute, Departmente of Plant Biology, 8, 19.
- Myers, N., R. A. Mittermeier, C. G. Mittermeier, G. A. B. D. F. y J. K. (2000). Conservation: Biodiversity as a bonus prize. *Nature*, 468(7326), 895. <https://doi.org/10.1038/468895a>.
- Nei M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 70: 3321-3323.
- Nei M., Kumar S. (2000) *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press. USA: 231-275
- Oliveira E.J., Pádua J.G., Zucchi M.I., et al.(2006). Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. *Genetics and Molecular Biology* 29: 294–307.
- Porebski, S., Bailey, L. G., & Baum, B. R. (1997). Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components. *Plant Molecular Biology Reporter*, 15, 8–15.
- Porrás-Hurtado, L., Ruiz, Y., Santos, C., Phillips, C., & Carracedo, Á. (2013). An overview of STRUCTURE : applications , parameter settings , and supporting software. *Statistical Genetics and Methodology*, 4(May), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fgene.2013.00098>.
- Pritchard J.K., Stephens M. & Donnelly P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945–959.
- Pritchard J.K., Wen X. Falush D. (2010). Documentation for Structure Software : Version 2.3. University of Chicago & University of Oxford.

- Pritchard, J. K., Wen X. & Falush D. (2010). Documentation for STRUCTURE software. Available with the program at <http://pritch.bsd.uchicago.edu/structure.html>.
- Raimondi, A. (1874). *El Perú Tomo I, parte preliminar*.
- Rivadeneira Gallegos, G. S. (2016). *Estructura Genética y Ecológica de poblaciones de Puya hamata (Bromeliaceae) en el Páramo del Volcán Chiles*. Pontificia Universidad Católica del Ecuador.
- Rivera, C. A. (1985). *Puya raimondii* Harms. *Boletín de Lima*, 38, 85–91.
- Rodríguez, D., Grajal-Martín, M. J., Isidró, M., Petit, S., & Hormaza, J. I. (2013). Polymorphic microsatellite markers in pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merrill). *Scientia Horticulturae*, 156, 127–130.
- Rozzi, S., & Nazionale, P. (2015). Una experiencia de gestión en áreas protegidas a través del deporte, para la promoción del desarrollo alternativo sostenible. *Perfil de Proyecto Para El Fortalecimiento de Capacidades Locales Dirigidas Al Logro de Las Eco-Sostenibilidad Del ACR Titankayoc*, 46.
- Salazar Castillo, J., & Villasante Benavides, F. (2012). Distribución geográfica y situación actual de *Puya raimondii* Harms en la Región de Arequipa - Perú. Octubre 2009 – Marzo 2011. *Quad. Bot. Amb. Appl.*, 23, 31–39. Retrieved from [http://ortobotanico.unipa.it/quaderni/23\\_031.pdf](http://ortobotanico.unipa.it/quaderni/23_031.pdf).
- Salinas, L., Arana, C., & Suni, M. (2007). El néctar de especies de *Puya* como recurso para picaflores Altoandinos de Ancash, Perú. *Revista Peruana de Biología*, 14(1), 129–134.
- Schuchmann K. L. (1999). Family Trochilidae (Hummingbirds). In: J. del Hoyo, A. Elliott, & J. Sargatal (eds.). *Handbook of the Birds of the World*. Vol. 5. Lynx Edicions, Barcelona.
- Schulte, K., Silvestro, D., Kiehlmann, E., Vesely, S., Novoa, P., & Zizka, G. (2010). Detection of recent hybridization between sympatric Chilean *Puya* species (Bromeliaceae) using AFLP markers and reconstruction of complex relationships. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 57, 1105–1119.
- Sgorbati, S., Labra, M., Grugni, E., Barcaccia, G., Galasso, G., Boni, U., ... Scannerini, S. (2004). A survey of genetic diversity and reproductive biology of *Puya raimondii* (Bromeliaceae), the endangered queen of the Andes. *Plant Biology*, 6(2), 222–230. <https://doi.org/10.1055/s-2004-817802>.
- Shapcott, A., James, H., Simmons, L., Shimizu, Y., Gardiner, L., Rabehevitra, D., ... Rakotoarinivo, M. (2017). *Population modelling and genetics of a critically endangered Madagascan palm Tahina spectabilis*. (November 2019), 3120–3137. <https://doi.org/10.1002/ece3.6137>.
- Slatkin, M. (1994). A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequency. *Genetics*, 139, 457–462.
- Smith, L. B., & Downs, R. J. *Flora Neotrópica Monograph Nro 14(Pitcairnoideae-Bromeliaceae)*. , (1974).
- Sosa, P.; Batista, F.; González, M.A. y Bouza N. (2002) La Conservación Genética de las Especies Amenazadas en: *Biología de la Conservación de Plantas Amenazadas: Técnicas de Diagnóstico*

- del Estado de Conservación. Bañares, (133-160). Organismo Autónomo de Parques Nacionales, España.
- Stearns, Stephen C. (1992). *The Evolution of Life Histories*. Oxford University Press, London xii + 249 pp., El6.95.
- Suni, M., Cano, A., & Vadillo, G. (2001). Ensayos preliminares de germinación en *Puya raimondii* harms (Bromeliaceae). *Revista Peruana de Biología*, 8(1), 53–59. <https://doi.org/10.15381/rpb.v8i1.6513>.
- Templeton, A.R. (2006). *Population genetics and microevolutionary theory*. Library of Congress, Estados Unidos de América, 713p.
- Untergasser, A., Cutcutache I., Koressaar T., Ye J., Faircloth B. C., Remm M., & S.G. Rozen. (2012). Primer3. New capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research* 40: e115.
- Vadillo, G. (2011). *Bases para la Conservación de P. raimondii Harms (Bromeliaceae)*. Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
- Vadillo, G., & Suni, M. (2006). Evaluación de sustratos para el establecimiento en laboratorio de plántulas de *Puya raimondii* Harms (Bromeliaceae). *Revista Peruana de Biología*, 13(1), 139–141.
- Vadillo, G., Suni, M., & Roca, W. (2007). Evaluación de la diversidad genética y morfológica de *Puya raimondii*. *Inrena*. Retrieved from [https://www.serfor.gob.pe/portal/pdf/estudios\\_cientificos/Flora\\_Silvestre/Evaluación\\_de\\_la\\_Diversidad\\_Genética\\_y\\_Morfológica\\_de\\_Puya\\_raimondii.pdf](https://www.serfor.gob.pe/portal/pdf/estudios_cientificos/Flora_Silvestre/Evaluación_de_la_Diversidad_Genética_y_Morfológica_de_Puya_raimondii.pdf).
- Venero G.J.L.; Hosting Raimer. (1986). Las “ ’ Titancas” de Aymaraes. *Boletín de Lima*, 48, 83–88.
- Villiger, F. (1981). Rodales de *Puya raimondii* y su protección. *Boletín de Lima*, 10, 84–91.
- Wang, X., Zhong, L., Wu, Z., Sun, H., Wang, H., Li, D., & Barrett, S. C. H. (2019). *Characterization of 30 microsatellite markers in distylous Primula sinolisteri ( Primulaceae ) using HiSeq sequencing*. 7(1), 3–7. <https://doi.org/10.1002/aps3.1208>.
- Weber, J. L. (1990). Informativeness of human (dC-dA)n(dG-dT)n polymorphisms. *Genomics*, 7(4), 524–530. [https://doi.org/10.1016/0888-7543\(90\)90195-Z](https://doi.org/10.1016/0888-7543(90)90195-Z).
- Weeks, A. R., Sgro, C. M., Young, A. G., Frankham, R., Mitchell, N. J., Miller, K. A., Hoffmann, A. A. (2011). *Assessing the benefits and risks of translocations in changing environments: a genetic perspective*. 4, 709–725. <https://doi.org/10.1111/j.1752-4571.2011.00192.x>.
- Weir B. & Cockerham C. (1984). Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38: 1358-1370.
- Wright, S. (1951). The genetical structure of populations. *Annals of Eugenics*, 15, 323–354.
- Young, K. R., Ulloa, C. U., Luteyn, J. L., & Knapp, S. (2002). Plant evolution and endemism in Andean South America: An introduction. *Botanical Review*, 68(1), 4–21. [https://doi.org/10.1663/0006-8101\(2002\)068](https://doi.org/10.1663/0006-8101(2002)068).

- Yuan, S., Zeng, G., Shi, M., & Zhang, D. (2017). Development of EST-SSR Markers for *Primula ovalifolia* (Primulaceae) by Transcriptome Sequencing. *Applications in Plant Sciences*, 5(12). <https://doi.org/10.3732/apps.1700100>.
- Zanella, C. M., Bruxel, M., Paggi, G. M., Goetze, M., Buttow, M. V., Cidade, F. W., & Bered, F. (2011). Genetic structure and phenotypic variation in wild populations of the medicinal tetraploid species *Bromelia antiacantha* (Bromeliaceae). *American Journal of Botany*, 98(9), 1511–1519. <https://doi.org/10.3732/ajb.1000458>.
- Zanella, C. M., Janke, A., Paggi, G. M., Goetze, M., Reis, M. S., & Bered, F. (2012). Microsatellites in the endangered species *Dyckia distachya* (Bromeliaceae) and cross-amplification in other bromeliads. *International Journal of Molecular Sciences*, 12, 15859–15866.
- Zhang, A., Gao, Y., Li, G., & Qian, Z. (2018). *amplification of microsatellite markers for Psammosilene tunicoides (Caryophyllaceae)*. 6(12), 4–7. <https://doi.org/10.1002/aps3.1199>

# **ANEXOS**

## ANEXO 1: DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD



Escuela de Posgrado

### DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD Y NO PLAGIO

#### DECLARACIÓN DEL GRADUADO

Por el presente, el graduando: (Apellidos y nombres)

**Tumi Calisaya Milagros Liscely**

en condición de egresado del Programa de Posgrado:

**Maestría en Ecología y Gestión Ambiental**

deja constancia que ha elaborado la tesis intitulada:

**Estructura y Diversidad Genética de *Puya raimondii* Harms  
“El gigante de los Andes Peruanos”**

Declara que el presente trabajo de tesis ha sido elaborado por el mismo y no existe plagio/copia de ninguna naturaleza, en especial de otro documento de investigación (tesis, revista, texto, congreso, o similar) presentado por cualquier persona natural o jurídica ante cualquier institución académica, de investigación, profesional o similar.

Deja constancia que las citas de otros autores han sido debidamente identificadas en el trabajo de investigación, por lo que no ha asumido como suyas las opiniones vertidas por terceros, ya sea de fuentes encontradas en medios escritos, digitales o de la Internet.

Asimismo, ratifica que es plenamente consciente de todo el contenido de la tesis y asume la responsabilidad de cualquier error u omisión en el documento y es consciente de las connotaciones éticas y legales involucradas.

En caso de incumplimiento de esta declaración, el graduando se somete a lo dispuesto en las normas de la Universidad Ricardo Palma y los dispositivos legales vigentes.

Firma del graduado

17/07/2020

Fecha

**ANEXO 2: AUTORIZACIÓN DE CONSENTIMIENTO PARA REALIZAR LA INVESTIGACIÓN**



**Escuela de Posgrado**

**AUTORIZACIÓN PARA REALIZAR LA INVESTIGACIÓN**

**DECLARACIÓN DEL RESPONSABLE DEL AREA O DEPENDENCIA DONDE SE REALIZARA LA INVESTIGACIÓN**

Dejo constancia que el área o dependencia que dirijo, ha tomado conocimiento del proyecto de tesis titulado:

**Estructura y Diversidad Genética de *Puya raimondii* Harms  
“El gigante de los Andes Peruanos”**

el mismo que es realizado por el Sr./Srta. Estudiante (Apellidos y nombres):

**Tumi Calisaya Milagros Liscely**

, en condición de estudiante - investigador del Programa de:

**Maestría en Ecología y Gestión Ambiental**

Así mismo señalamos, que según nuestra normativa interna procederemos con el apoyo al desarrollo del proyecto de investigación, dando las facilidades del caso para aplicación de los instrumentos de recolección de datos.

En razón de lo expresado doy mi consentimiento para el uso de la información y/o la aplicación de los instrumentos de recolección de datos:

<b>Nombre:</b> <b>LABORATORIO DE FISIOLÓGÍA VEGETAL DE LA UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN MARCOS</b>	Autorización para el uso del nombre de la Empresa en el Informe Final	<b>SI</b>
--	---	-----------

Apellidos y Nombres del Jefe/Responsable del área: <b>Mg. Sc. Mery Suni Ninataype</b>	Cargo del Jefe/Responsable del área: <b>Responsable del Laboratorio de Fisiología Vegetal-Facultad de Ciencias Biológicas-UNMSM</b>
--	--

Teléfono fijo (incluyendo anexo) y/o celular: <b>6197000 anexo 1524</b>	Correo electrónico <b>msunin@unmsm.edu.pe</b>
--	--

\_\_\_\_\_  
Firma

\_\_\_\_\_  
Fecha



**ANEXO 3: MATRIZ DE CONSISTENCIA**

<b>PROBLEMA GENERAL</b>	<b>OBJETIVO GENERAL</b>	<b>HIPÓTESIS GENERAL</b>	<b>VARIABLES GENERALES</b>	<b>DIMENSIONES</b>	<b>INDICADORES</b>	<b>TÉCNICAS/ INSTRUMENTOS</b>
¿La diferenciación genética entre las poblaciones de <i>Puya raimondii</i> de Choconchaca (Puno), Pachapaqui (Ancash) y Yanacancha (Junín) tiene correspondencia con los morfotipos en el Norte y Sur de los Andes de Perú?	Evaluar la diversidad genética y estructura genética en las poblaciones de Choconchaca (Puno), Pachapaqui (Ancash) y Yanacancha (Junín) para establecer unidades de conservación.	El rango de distribución de <i>Puya raimondii</i> está estructurado en dos poblaciones genéticas que se corresponden con los morfotipos reportados en el Norte y Sur de los Andes de Perú.			X1: Población X2: Latitud X3: Longitud X4: Tamaño	Para la extracción de muestras foliares para obtención de ADN genómico, se hará medidas de tamaño y coordenadas a cada individuo en evaluación; posteriormente se realizará una réplica de tres muestras de la lámina foliar para el Museo de Historia Natural.
<b>PROBLEMAS ESPECÍFICOS</b>	<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b>	<b>HIPÓTESIS ESPECÍFICAS</b>	X: <i>Puya raimondii</i> Harms.	Ecológicos		
¿La estructura genética tiene correspondencia con los morfotipos de <i>Puya raimondii</i> en el Norte y Sur de los Andes de Perú?	Evaluar la correspondencia de la estructura y diversidad genética de <i>Puya raimondii</i> con sus morfotipos en los Andes de Perú en las poblaciones de Choconchaca (Puno), Pachapaqui (Ancash) y Yanacancha (Junín).	La estructura genética presenta correspondencia con los morfotipos de <i>Puya raimondii</i> en el Norte y Sur de los Andes de Perú.		Geográficos	Y1:N° de alelos en un locus (A) Y2:Heterocigosidad Y3:Índice de contenido polimórfico (PCI)	Extracción de ADN genómico Selección de marcadores microsatélites

<p>¿Las poblaciones de <i>Puya raimondii</i> de Choconchaca (Puno), Pachapaqui (Ancash) y Yanacancha (Junín) presentan diversidad genética?</p>	<p>Estimar el nivel de endogamia de las poblaciones de Choconchaca (Puno), Pachapaqui (Ancash) y Yanacancha (Junín) dentro del rango de distribución y en los Andes de Perú.</p>	<p>Las poblaciones de <i>Puya raimondii</i> para las localidades de Choconchaca (Puno), Pachapaqui (Ancash) y Yanacancha (Junín) presentan diferenciación genética.</p>	<p>Y: Variabilidad genética</p>	<p>Biológicos</p>	<p>Y4: Prueba de equilibrio Hardy-Weinberg (EHW)</p>	<p>Amplificación de los microsatélites</p> <p>Análisis: GeneMarker</p> <p>Estructura poblacional: K y delta K</p>
<p>¿Cuáles serían las localidades para proponer futuras áreas de conservación para <i>Puya raimondii</i> en el Perú?</p>	<p>Definir lineamientos base para la conservación de las poblaciones de <i>Puya raimondii</i> en los Andes de Perú.</p>	<p>La localidad que presente una alta diversidad genética y diferente estructura genética sería considerado una futura área de conservación regional de <i>Puya raimondii</i> en el Perú.</p>			<p>Z: Estructura genética</p>	<p>Moleculares</p> <p>Genéticos</p>

## ANEXO 4. PROTOCOLOS O INSTRUMENTOS UTILIZADOS

### PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE DNA GENÓMICO A PARTIR DE HOJAS

1. Prender la cámara de extracción.
2. Elegir las muestras que son pequeñas fracciones de hojas en buenas condiciones.
3. Preparar tubos de 1 mL con CTBA y colocarlos en la cámara de extracción, previamente codificadas.
4. Desinfectar con un 1 mL de etanol a los instrumentos de trituración: mortero y espátula.
5. Colocar media cucharada de QUARTZ SiO<sub>2</sub> al mortero.
6. Colocar las muestras (pequeñas fracciones foliares) en el mortero con QUARTZ SiO<sub>2</sub>.
7. Adicionar nitrógeno líquido para la trituración, realizarlo rápido y fuerte.
8. Retirar la muestra resultante del punto 7 a tubos con CTBA, previamente preparados, este paso realizarlo de manera muy rápido para no degradar el DNA.
9. Realizar un mix de manera manual a las muestras trituradas con CTBA.
10. Colocar los tubos mezclados en baño maría a temperatura de 65°C por 40 minutos – 1 hora (realizar un mix para homogenizar la mezcla cada 10 minutos).
11. Adicionar 800 µL de cloroformo + Isopropil a los tubos del punto 10 (realizarlo dentro de la cámara de extracción).
12. Realizar un mix de manera manual por 5 minutos.
13. Centrifugar a 1200 rpm por 10 minutos.
14. Extraer el sobrenadante de los tubos para colocarlos en nuevos tubos (previamente codificados).
15. Adicionar 800 µL de cloroformo + Isopropil.
16. Realizar un mix manual por 5 minutos.
17. Centrifugar a 1200 rpm por 10 minutos.
18. Preparar tubos de 1.5 mL con codificación.
19. Colocar todo el sobrenadante de los tubos post centrifuga a los tubos de 1.5 mL.
20. Adicionar 500 µL de Isopropil (hacer un mix manual).
21. Colocar la muestra resultante en la refrigeradora por 2-6 horas.
22. Centrifugar a 1200 rpm por 10 minutos.
23. Extracción de todo el sobrenadante de los tubos.
24. Preparar una dilución de 75% de etanol, mediante la siguiente formula:  
**N° de muestras x 800 µL x 2 (tiempo)**
25. Colocar 800 µL de la dilución (75% de etanol).
26. Centrifugar a 1200 rpm por 6 minutos.
27. Extracción de todo el sobrenadante de los tubos.
28. Colocar 800 µL de la dilución (75% de etanol).
29. Centrifugar a 1200 rpm por 6 minutos.
30. Extracción de todo el sobrenadante de los tubos.
31. Centrifugar a 1200 rpm por 3 minutos.
32. Extracción de todo el sobrenadante de los tubos.
33. Lavar el DNA primero con 800 µL y luego con alcohol puro (se recomienda realizar un centrifugado por dos minutos a 1200 rpm).
34. Dejar los tubos abiertos aproximadamente por 1 hora.
35. Adicionar 50 µL de agua pura sacada de la refrigeradora (colocar cerca al DNA).
36. Disolver el DNA en el agua pura sacada de la refrigeradora.
37. Dejar las muestras resultantes en el refrigerador.

### PROTOCOLO PARA REVISAR LA CALIDAD DE DNA

1. Preparar 1% de agarosa, por ejemplo 0.6 agarosa + 60 mL TBE (para una cámara pequeña).
2. Colocar en la microonda por 4 minutos (se recomienda con nuevos guantes).
3. Adicionar 1 µL de EB en la matriz.
4. Colocarlo en la cámara de corrida.
5. Esperar 1 hora para que el gel se solidifique.
6. Preparar un mix que consiste en 3 µL de buffer más 3 µL de DNA (mezclar dentro de una pipeta).
7. Colocar la mezcla dentro de la cámara que contiene el gel de agarosa sólido.
8. Encender la cámara electroforética por media hora a 160 v.
9. Colocar los geles para revisarlos dentro de una computadora mediante imágenes.

### PROTOCOLO PARA PCR-1

1. Preparación del DNA:  
Usar tubos de 1.5 mL.  
Colocar 495 µL de agua.  
Adicionar 5 µL de DNA.  
Realizar un mix manual.
2. Preparación de la mezcla:  
LA Buffer= Buffer II (Mg<sup>+2</sup> + plus). Número de lote A8701A Store at- 20C Takara.  
dNTP Mix. Número de lote BK7901A Store at-20 Takara.
3. Adicionar de acuerdo a las siguientes cantidades y multiplicar por el número de muestras:

REACTIVO	CANTIDAD (µL)	CANTIDAD POR NÚMERO DE MUESTRAS (ejemplo 10)
LA Buffer	1	10 µL
dNTP	0.8	8 µL
Taq	0.06	0.6 µL
<b>Pri R *</b>	<b>0.25</b>	-
<b>Pri R *</b>	<b>0.25</b>	-
DNA	1	
H2O	6.64	66.4 µL~ 70 µL

\*Ambos primer deben sumar 1 µL.

### PROTOCOLO PARA PCR-2

4. Adicionar 9.5  $\mu\text{L}$  de la mezcla obtenida del punto número 3.
5. Adicionar 1  $\mu\text{L}$  de Primer.
6. Colocar en el Termociclador con las siguientes condiciones:

TEMPERATURA	TIEMPO
A. 94 °C	3 minutos
B. 94 °C	40 segundos
C. 61 °C	1 minuto
D. 72 °C	1 minuto
E. 72 °C	5 minutos

7. Tiempo de corrida para el PCR aproximadamente 2 horas.
8. Preparación del gel de agarosa al 2%, por ejemplo 0.900 de agarosa más 45 mL de TBE para una cámara grande.
9. Colocar en la microonda por 4 minutos.
10. Adicionar 4  $\mu\text{L}$  de EB en la matriz.
11. Esperar 1 hora para que el gel se solidifique.
12. Adicionar 1 $\mu\text{L}$  de Buffer más 5  $\mu\text{L}$  de la muestra resultante del PCR (mezclar dentro de una pipeta).
13. Colocar la mezcla dentro de la cámara que contiene el gel de agarosa sólido.
14. Colocar también 2  $\mu\text{L}$  de DNA marker (DL 2,000 DNA Marker).
15. Encender la cámara electroforética por media hora a 160 v.
16. Colocar los geles para revisarlos dentro de una computadora mediante imágenes.

## ANEXO 5. FORMATO DE INSTRUMENTOS O PROTOCOLOS UTILIZADOS

### Anexo 5.1. Ficha de campo para la recolección de muestras de herbario.

N°	Fecha de colecta	Nombre del colector	Departamento	Provincia	Distrito	Lugar	N° de repetición	Altura de la planta (cm)	Pendiente	Exposición	Hábitat	Latitud	Longitud	Latitud	Altitud (msnm)	Código GPS	Código de foto
1.																	
2.																	
3.																	
4.																	
5.																	
6.																	
7.																	
8.																	
9.																	
10.																	
11.																	
12.																	

**Anexo 5.2.** Ficha de colecta para muestras de ADN.

NOMBRE DEL RESPONSABLE:		FECHA:	
LOCALIDAD:	DISTRITO:	DEPARTAMENTO:	
LATITUD:			
LONGITUD:			
ALTITUD (msnm):			

N°	CÓDIGO DEL INDIVIDUO	NÚMERO DE PARCHE	ALTURA DE LA PLANTA	PENDIENTE	EXPOSICIÓN	HABITAT	CÓDIGO DE GPS	CÓDIGO DE FOTO	OBSERVACIONES
1.									
2.									
3.									
4.									
5.									
6.									
7.									
8.									
9.									
10.									
11.									

## ANEXO 6. TABLAS DE VALIDEZ

**Anexo 6.1.** Lista de personas involucradas dentro del proyecto “Variabilidad genética y foliar de las poblaciones de *Puya raimondii* Harms”, producto del Convenio entre South China Botanical Garden de la Academia de Ciencias de China y la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos

<b>Nombre y Apellido</b>	<b>Institución de procedencia</b>	<b>Cargo en el Proyecto</b>
Mery Luz Suni Ninataype	Universidad Nacional Mayor de San Marcos	Responsable
Giovana Patricia Vadillo Gálvez	Universidad Nacional Mayor de San Marcos	Colaborador
Milagros Liscely Tumi Calisaya	Universidad Nacional Mayor de San Marcos	Colaborador
Gerson Enrique Prado Aliaga	Universidad Nacional Mayor de San Marcos	Colaborador
Karen Anais Santisteban Obregón	Universidad Nacional Mayor de San Marcos	Colaborador
Jean Carlos Salcedo Aliaga	Universidad Nacional Mayor de San Marcos	Colaborador
Beatriz Roca Ramos	Universidad Nacional Mayor de San Marcos	Colaborador
Rocio Quispe Cruz	Universidad Nacional Mayor de San Marcos	Colaborador
Mónica Arakaki Arakaki	Universidad Nacional Mayor de San Marcos	Colaborador
Alfredo Berrocal Huallpa	Universidad Nacional Mayor de San Marcos	Colaborador
Cesa Quin Candela	Universidad Nacional Mayor de San Marcos	Colaborador
Xue-Jun Ge	Laboratorio de Biología Molecular de SCBG	Responsable
Yuqu Zhang	Laboratorio de Biología Molecular de SCBG	Colaborador



**Anexo 6.2.** Registro de colecta para muestras de ADN.

CI	Longitud	Latitud	Altitud	HT	CI	Longitud	Latitud	Altitud	HT
Pa 1	9.95113	77.06357	4100	162	Cchi 2	-75.47569	-12.24676	4125	99
Pa 2	9.95113	77.06357	4100	213	Cchi 3	-75.47659	-12.24634	4154	84
Pa 3	9.95113	77.06357	4100	107	Cchi 4	-75.47693	-12.24525	4179	90
Pa 4	9.95113	77.06357	4100	75	Cchi 5	-75.47713	-12.24500	4193	111
Pa 5	9.95113	77.06357	4100	170	Cchi 6	-75.47746	-12.24465	4217	104
Pa 6	9.95113	77.06357	4100	63	Cchi 7	-75.47763	-12.24435	4237	117
Pa 7	9.95113	77.06357	4100	154	Cchi 8	-75.47777	-12.24420	4250	92
Pa 8	9.95113	77.06357	4100	80	Cchi 9	-75.47792	-12.24386	4265	107
Pa 9	9.95113	77.06357	4100	266	Cchi 10	-75.47807	-12.24369	4280	119
Pa 10	9.95113	77.06357	4100	181	Cchi 11	-75.48125	-12.24075	4327	130
Pa 11	9.95501	77.07893	4017	262	Cchi 12	-75.48145	-12.24053	4338	84
Pa 12	9.95501	77.07893	4017	190	Cchi 13	-75.48190	-12.24009	4339	107
Pa 13	9.95501	77.07893	4017	69	Cchi 14	-75.48244	-12.23984	4331	88
Pa 14	9.95501	77.07893	4017	76	Cchi 15	-75.48264	-12.23957	4328	86
Pa 15	9.95501	77.07893	4017	162	Cchi 16	-75.48223	-12.23881	4258	90
Pa 16	9.95501	77.07893	4017	87	Cchi 17	-75.48111	-12.23876	4203	95
Pa 17	9.95501	77.07893	4017	77	Cchi 18	-75.47997	-12.23905	4197	88
Pa 18	9.95501	77.07893	4017	134	Cchi 19	-75.47727	-12.24185	4154	87
Pa 19	9.95501	77.07893	4017	128	Cchi 20	-75.47654	-12.24298	4124	101
Pa 20	9.95501	77.07893	4017	140	Choc 1	70.34962	15.25643	3875	150
Pa 21	9.95501	77.07893	4017	130	Choc 2	70.35002	15.25579	3907	92
Pa 22	9.95501	77.07893	4017	140	Choc 3	70.35136	15.2571	3953	130
Pa 23	9.95501	77.07893	4017	133	Choc 4	70.35151	15.25745	3980	142
Pa 24	9.95501	77.07893	4017	142	Choc 5	70.35251	15.25758	3996	174
Pa 25	9.95354	77.07574	4019	160	Choc 6	70.35263	15.25776	4007	114
Pa 26	9.95354	77.07574	4019	110	Choc 7	70.35434	15.25765	3967	105
Pa 27	9.95311	77.07571	3975	167	Choc 8	70.35417	15.25793	3982	163
Pa 28	9.95311	77.07571	3975	175	Choc 9	70.35406	15.25798	3988	133

CI: Código del individuo

HT=Altura de la planta

CI	Longitud	Latitud	Altitud	HT	CI	Longitud	Latitud	Altitud	HT
Hu 1	-75.43403	-12.23608	4021	96	Choc 10	70.35437	15.25798	3983	125
Hu 2	-75.43414	-12.23616	4030	109	Choc 11	70.35457	15.25762	3964	172
Hu 3	-75.43550	-12.23577	4093	111	Choc 12	70.35466	15.255752	3955	162
Hu 4	-75.43593	-12.23588	4116	82	Choc 13	70.35484	15.257	3931	90
Hu 5	-75.43620	-12.23530	4121	95	Choc 14	70.35402	15.25465	3880	71
Hu 6	-75.43653	-12.23488	4130	122	Choc 15	70.35403	15.25484	3880	114
Hu 7	-75.43700	-12.23444	4138	108	Choc 16	70.35389	15.255	3901	103
Hu 8	-75.43737	-12.23420	4142	103	Choc 17	70.35332	15.25504	3918	95
Hu 9	-75.43771	-12.23379	4146	96	Choc 18	70.356	15.25792	4212	113
Hu 10	-75.43826	-12.23366	4167	90	Choc 19	70.35606	15.25741	3921	151
Hu 11	-75.43856	-12.23339	4172	108	Choc 20	70.35638	15.25706	3903	77
Hu 12	-75.43932	-12.23276	4174	110	Choc 21	70.3564	15.25796	3916	181
Hu 13	-75.43978	-12.23256	4181	109	Choc 22	70.35755	15.25801	3949	110
Hu 14	-75.44034	-12.23246	4194	97	Choc 23	70.35733	15.25794	3950	98
Hu 15	-75.44103	-12.23222	4205	82	Choc 24	70.35729	15.25819	3962	153
Hu 16	-75.44156	-12.23200	4213	94	Choc 25	70.357	15.25804	3956	152
Hu 17	-75.44207	-12.23176	4224	77	Choc 26	70.35778	15.25801	3949	133
Hu 18	-75.44229	-12.23116	4212	113	Choc 27	70.35715	15.2582	3960	129
Hu 19	-75.44183	-12.23086	4195	84	Choc 28	70.35785	15.25836	3968	120
Hu 20	-75.44082	-12.23132	4171	97	Choc 29	70.35707	15.25829	3960	125
Cchi 1	-75.47552	-12.24710	4116	94	Choc 30	70.35704	15.25814	3962	192

CI: Código del individuo

HT=Altura de la planta

**Anexo 6.3.** Característica de los 34 microsatélites monomórficos identificados en *Puya raimondii*.

<b>Locus</b>	<b>Secuencia de Primer (5' – 3')</b>	<b>Motivo de repetición</b>	<b>Rango del tamaño del alelo (pb)</b>	<b>Fluoróforo</b>	<b>N° accesión en el GenBank</b>
Puya-004	F: GTCCACGCAAAAAGGATCA R: GAGGGGAATTGGAAACCCTA	(TTCCCG)6 ...(CT)12	261	TAMRA	MN218733
Puya-008	F: AGAGGGTTCACCGTAGAGCA R: CGCAGGTAGGAGAAGAGCTG	(TATGTG)4	229	FAM	MN218734
Puya-010	F: AGAAAATTCCCAAGGCTGTG R: GGAATAGCCAGCCAAGGTAG	(TCCTAT)7	237	FAM	MN218736
Puya-014	F: TGAAGATGCTGTGTGCTGTG R: TTTGCCCTTTGGACTCATCT	(GCAA)4	244	FAM	MN218738
Puya-015	F: ACGCTTCAGAACTCAAGAATC R: CGACCGTAGGAGGAAGAGAA	(TAAT)4	193	FAM	MN218739
Puya-017	F: TCCCCTCCTTTTGCTAGAAC R: TCGGTGAAGCCCATATGAA	(TTTC)4	228	HEX	MN218741
Puya-018	F: CGCAACTCTGCGAACTGTAG R: GAAGGTTCTCCACCACCAAA	(AGAA)5	227	FAM	MN218742
Puya-019	F: CGGCAACCAGAAAAGAAGAAG R: TTCTCTCCCTTCTCTCGGCT	(TTC)13	230	FAM	MN218743
Puya-021	F: TGAGGAAGCAGCTCAAGGAGA R: TATTTTGAACCGATCCGAGG	(TCG)5	240	FAM	MN218744
Puya-022	F: ACTTGCACCTCGTCAGCAC R: GGCGAAGCTTGATGAGAGAA	(CTC)7	156	FAM	MN218745
Puya-023	F: AAAACGATACCAAAATCCATGT R: GGTGGTGCAATTAATTTGGTG	(TCA)6	229	FAM	MN218746
Puya-025	F: TTCATGTTGCATTGTGCTGA R: TGAACCCATGCAGAACAAAC	(TTG)7	152	FAM	MN218747
Puya-028	F: TGATCAGCCGAATACATTGC R: GCCAATGCAATTCCTTCTA	(TTC)10	205	FAM	MN218748
Puya-030	F: AATTCGATTCCCCAAAGTCC R: GACTCGTCGTTGAGGAGCAC	(GTC)8	232	TAMRA	MN218749
Puya-031	F: ATTCGGCTGAAGGTGCAGTA R: ATGCGAGCTTGTAAGGAAGC	(CTT)12	235	TAMRA	MN218750
Puya-033	F: CCGAATTTGCCACAAATCTT R: AAAGGGTTCAGGCGATGTTA	(AGA)5	291	TAMRA	MN218751
Puya-034	F: ATAGAGGCGACCATTTGTCA R: TTGCTTGTGGTGCTATTTGC	(GAT)7	226	FAM	MN218752
Puya-040	F: AAGGAATTATGAGCGCATGG R: TGTGAACCCACAGAATCAGC	(AG)19	182	FAM	MN218755

<b>Locus</b>	<b>Secuencia de Primer (5' – 3')</b>	<b>Motivo de repetición</b>	<b>Rango del tamaño del alelo (pb)</b>	<b>Fluoróforo</b>	<b>N° accesión en el GenBank</b>
Puya-044	F: AGGGCTCCTTCTCTCCTG R: GGCCAGAGGTAAAGGGGTAG	(CT)12	205	FAM	MN218756
Puya-048	F: TGCAAAATACACGAAGGAAGC R: GGGATGGTGAAGAAATGGTG	(TC)6	216	FAM	MN218757
Puya-050	F: TGTATTATCCCTTCAGAACTTGC R: TCGCATACATAGGACGAGTCA	(CT)7	181	FAM	MN218758
Puya-051	F: AACACCGAAGGTGGTTCTTG R: GCCTAGTTGCTTCGCATTTTC	(TG)12	199	FAM	MN218759
Puya-053	F: GTTTTCGATGCCGATTGATT R: GTCTTTGTGGCTGAGCGATT	(AT)9	246	TAMRA	MN218761
Puya-054	F: TCTTTACGTCCACACCTCCA R: TCTCTTCATCAGCGGGATCT	(CA)7	190	FAM	MN218762
Puya-055	F: AGCTCGGAGGAGGGTCTTAG R: CGAGATGAGCCTCAGAATCC	(CTC)8	160	FAM	MN218763
Puya-057	F: ACGGCAGCTCTATCCTCGTA R: GAGGACGTGAAGGTGTGGAT	(TCG)8	181	TAMRA	MN218764
Puya-059	F: ATCCGTTGTCGTCGGAATAG R: CTCCCTCTCTGTGGTTCG	(GCC)5	234	FAM	MN218765
Puya-060	F: CTACCGTTGATTCCCTGGAC R: CTCCGCCTACGAACAAAAC	(TTC)8	228	FAM	MN218766
Puya-062	F: CCTTCCAACCTCAGCTTG R: CAATCACTCTGGCTCACGAC	(TTG)9	246	FAM	MN218767
Puya-064	F:GGTGTGTGGTGTGTCAAGG R: GCTTCAAGATTTGTGCAGATG	(AGG)11	226	FAM	MN218768
Puya-066	F:TTGGGACTTCCAGGTCCTC R:GAGAGAAGGAGCCCTCATCA	(CT)7...(CT)7	272	FAM	MN218769
Puya-067	F:TCAGCGTTTGCTTATCGTTG R: TTTCCAGTGATTTGGGGTGT	(AG)6	236	TAMRA	MN218770
Puya-068	F: GGAAATGAGGTGTCGGTTGT R: GCTTGCTTTGTTCTTTGGCT	(AT)11	170	FAM	MN218771
Puya-070	F: ATCCTGCAACCAAACAGGAC	(TA)12	205	FAM	MN218773

**Anexo 6.4.** Tablas de frecuencias alélicas registrada para los 12 marcadores SSR en las localidades Cachi, Huáscar, Lampa y Pachapaqui para *Puya raimondii*.

Fluoróforo	Locus	Allele/n	NOMBRE DE LA LOCALIDAD			
			Cachi	Huáscar	Lampa	Pachapaqui
FAM	Puya-002	200	0.000	0.000	0.018	0.000
		201	0.000	0.000	0.018	0.000
		202	0.000	0.000	0.089	0.000
		203	0.000	0.036	0.071	0.000
		204	0.000	0.071	0.000	0.000
		205	0.000	0.000	0.036	0.000
		207	0.800	0.607	0.571	1.000
		210	0.067	0.143	0.143	0.000
		211	0.000	0.071	0.036	0.000
		213	0.067	0.000	0.018	0.000
		214	0.000	0.071	0.000	0.000
		216	0.033	0.000	0.000	0.000
		218	0.033	0.000	0.000	0.000
		Puya-009	212	0.000	0.167	0.000
	217		1.000	0.833	1.000	1.000
	Puya-039	192	0.000	0.154	0.000	0.000
		194	0.929	0.692	0.000	1.000
		196	0.000	0.077	0.000	0.000
		198	0.000	0.077	0.000	0.000
		200	0.071	0.000	0.208	0.000
		202	0.000	0.000	0.792	0.000
	Puya-065	272	0.000	0.000	0.019	0.000
		274	0.000	0.036	0.000	0.000
		276	0.000	0.000	0.019	0.000
		280	1.000	0.857	0.852	1.000
		282	0.000	0.107	0.074	0.000
284		0.000	0.000	0.037	0.000	
HEX	Puya-012	245	0.000	0.000	0.000	0.019
		248	0.133	0.000	0.000	0.815
		250	0.033	0.000	0.093	0.148
		252	0.000	0.000	0.000	0.019
		255	0.033	0.071	0.000	0.000
		257	0.000	0.000	0.019	0.000
		260	0.733	0.929	0.889	0.000
		263	0.067	0.000	0.000	0.000
	Puya-046	202	0.000	0.071	0.000	0.000
		203	0.000	0.000	0.071	0.000
		205	0.958	0.607	0.893	1.000
		207	0.000	0.107	0.036	0.000
		209	0.000	0.071	0.000	0.000
		211	0.042	0.036	0.000	0.000
		213	0.000	0.107	0.000	0.000
	Puya-049	212	0.800	0.821	0.357	0.000
		214	0.200	0.071	0.179	0.981
		216	0.000	0.107	0.161	0.000
		218	0.000	0.000	0.304	0.000
		220	0.000	0.000	0.000	0.019
	Puya-069	187	1.000	0.909	0.917	0.963
		193	0.000	0.000	0.083	0.037
		212	0.000	0.091	0.000	0.000

Fluoróforo	Locus	Allele/n	NOMBRE DE LA LOCALIDAD			
			Cachi	Huáscar	Lampa	Pachapaqui
TAM	Puya-042	250	0.067	0.357	0	0
		252	0	0.071	0.607	0
		260	0.933	0.571	0.393	1
	Puya-016	181	0	0	0.037	0
		182	0	0	0.148	0
		184	0	0	0.815	0
		192	1	1	0	0.963
		194	0	0	0	0.037
	Puya-052	238	0	0	0.63	0.074
		240	1	1	0.259	0.926
		244	0	0	0.111	0
	Puya-037	240	0	0	0.107	0
		242	0.267	0.643	0.071	0
		244	0.733	0.357	0.821	1

Anexo 6.5. Fotografías del ecosistema donde habita de *Puya raimondii* en las localidades de muestreo.

