

**UNIVERSIDAD NACIONAL
TORIBIO RODRÍGUEZ DE MENDOZA DE AMAZONAS**



**FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGRARIAS
ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA AGRÓNOMA**

**PROYECTO DE TESIS PARA OBTENER
EL TÍTULO PROFESIONAL DE
INGENIERO AGRÓNOMO**

**EVALUACION MORFOLÓGICA, FISIOLÓGICA,
BIOQUÍMICA Y MOLECULAR DE 10 ACCESIONES
DE OLLUCO (*Ullucus tuberosus*) CULTIVADOS EN
LA REGION AMAZONAS**

Autor: Deyli Mailita Fernández Poquioma

Asesor: Dr. Jorge Alberto Condori Apfata

Registro:

CHACHAPOYAS - PERÚ

2025

1. Título

Evaluación morfológica, fisiológica, bioquímica y molecular de 10 accesiones de olluco (*Ullucus tuberosus*) cultivado en la región Amazonas.

2. Problema de la investigación

¿Cuál será la variabilidad morfológica, fisiológica, bioquímica y molecular entre diez accesiones de olluco (*Ullucus tuberosus*) cultivado en la región Amazonas?

3. Objetivos

3.1. Objetivo general

Caracterizar la variabilidad morfológica, fisiológica, bioquímica y molecular de 10 accesiones de olluco (*Ullucus tuberosus*) cultivado en la región Amazonas.

3.2. Objetivos específicos

- Evaluar las características morfológicas de diez accesiones de olluco.
- Evaluar los parámetros fisiológicos de diez accesiones de olluco.
- Analizar los compuestos bioquímicos del tubérculo de las diez accesiones de olluco.
- Caracterizar la variabilidad molecular de diez accesiones de olluco mediante el análisis de su genoma cloroplastidial.

4. Antecedentes de la investigación

El *Ullucus tuberosus*, conocido comúnmente como olluco, es un cultivo tuberoso originario de los Andes, ampliamente consumido en países como Perú, Bolivia y Ecuador, debido a su valor nutricional, diversidad morfológica y disponibilidad durante todo el año (Mancheno & Peralta, 2011; Parra-Quijano et al., 2012). El olluco es una planta que también se cultiva como hortaliza de hoja, presentando una adaptabilidad ecológica que le permite crecer a 2 800 m.s.n.m (Cejudo-Bastante et al., 2014), en suelos franco arenosos con pH moderadamente ácido y bajo diversos regímenes de precipitación (Naranjo Quinaluisa et al., 2018).

El olluco se encuentra distribuido particularmente en Perú y Ecuador, con nodos significativos en las provincias biogeográficas de Puno y los Yungas (Hernández, 2023). Es cultivado por más de 60 mil productores en Perú, y durante 2023, se llegó a reportar un área de cultivo de 42 912 ha con un rendimiento promedio de 7.62 t·ha⁻¹, generando

una producción total de 173 116 t (Flores-Marquez et al., 2024). Si bien su potencial productivo es menor que el de otros tubérculos o raíces andinas, la ausencia del olluco en el departamento de Amazonas podría explicarse por las condiciones climáticas y edafológicas poco favorables para su desarrollo, ya que esta especie se adapta mejor a los ambientes subhúmedos y de gran altitud de los Andes (Zimmerer, 2003) y por una limitada presencia de conocimientos y prácticas tradicionales.

Ullucus tuberosus es una Basellaceae andina (Romero-Carpio & Estrada-Jiménez, 2005). En cuanto a su gran diversidad morfológica del olluco, evidenciada en la forma, tamaño y color (blanco, amarillo, rosado, naranja, magenta y rojo). de sus tubérculos, así como en sus características vegetativas, lo que representa un recurso valioso para la selección de cultivares adaptados a distintas condiciones agroecológicas (Steffanny Sanchez-Portillo et al., 2023). Este cultivo presentan una amplia variedad de colores debido a la acumulación de ciertos compuestos como antocianinas, clorofilas y carotenoides, destacando entre ellas las betalaínas, pigmentos menos estudiados pero con propiedades beneficiosas para la salud (Campos et al., 2006).

Desde el punto de vista evolutivo, el olluco es una especie domesticada desde tiempos precolombinos, cuya historia refleja procesos complejos de selección natural y humana (Siqueira et al., 2023). Investigaciones como las de (Pérez-Escobar et al., 2022) han vinculado la diversificación de esta especie con los procesos geológicos de elevación de los Andes, reforzando la importancia de conservar su diversidad genética. En este sentido, Pickersgill, (2007) y Malice et al. (2010) han resaltado la existencia de una alta variabilidad genética y diferencias morfológicas y fisiológicas significativas entre accesiones de olluco, utilizando marcadores moleculares como ISSR, lo que subraya la necesidad de estrategias de conservación *in situ* para garantizar la sostenibilidad de este cultivo.

A nivel nutricional, King & Gershoff (1987) identificaron una elevada variabilidad en el contenido de proteínas y aminoácidos esenciales entre cultivares, cuestionando los valores establecidos en tablas nutricionales previas y advirtiendo sobre la amenaza que representa la introducción de cultivares mejorados frente a las variedades tradicionales. Además, el olluco contiene compuestos bioactivos como fenoles, polisacáridos y aminoácidos esenciales, lo que le otorga un importante potencial nutracéutico (Campos et al., 2018). Desde el punto de vista físico-químico, su almidón presenta gránulos de

formas diversas (elipsoides, prismáticos, entre otros), con un tamaño de hasta 32.09 μm , 0.047 % de fósforo y 26.49 % de amilosa, características que se traducen en un bajo poder de hinchamiento, geles opacos de baja dureza y alta estabilidad en refrigeración (Valcárcel-Yamani et al., 2013).

Pese a su importancia, el cultivo de olluco enfrenta amenazas como las infecciones virales. (Fox et al., 2019) reportaron la aparición de nuevos virus que afectan a esta especie. En Perú, el cultivo se ve significativamente impactado por diversas amenazas (Health (PLH) et al., 2021), lo que evidencia la urgencia de implementar estrategias de manejo fitosanitario que garanticen su producción sostenible. En conjunto, estos estudios evidencian la relevancia de seguir investigando la variabilidad morfológica, fisiológica, bioquímica y molecular del *Ullucus tuberosus*, con el fin de preservar su diversidad y fomentar su aprovechamiento en sistemas agrícolas sostenibles.

5. Hipótesis

Existe variabilidad significativa en las características morfológicas, fisiológicas, bioquímicas y moleculares entre las diez accesiones de olluco (*Ullucus tuberosus*) cultivados en la región Amazonas.

6. Metodología

6.1. Población, muestra y muestreo

6.1.1. Ubicación de la investigación

La investigación se va realizar en el anexo El Mito distrito de Soloco, provincia de Chachapoyas, departamento de Amazonas, Perú. El campo experimental se instalará a latitud de 6°16'25.8" S; longitud de 77°46'44.7" W a 2580 m.s.n.m. Las condiciones climáticas de la zona son precipitación anual 936.2 mm; temperaturas máxima 15.8 °C (Zepner et al., 2021).

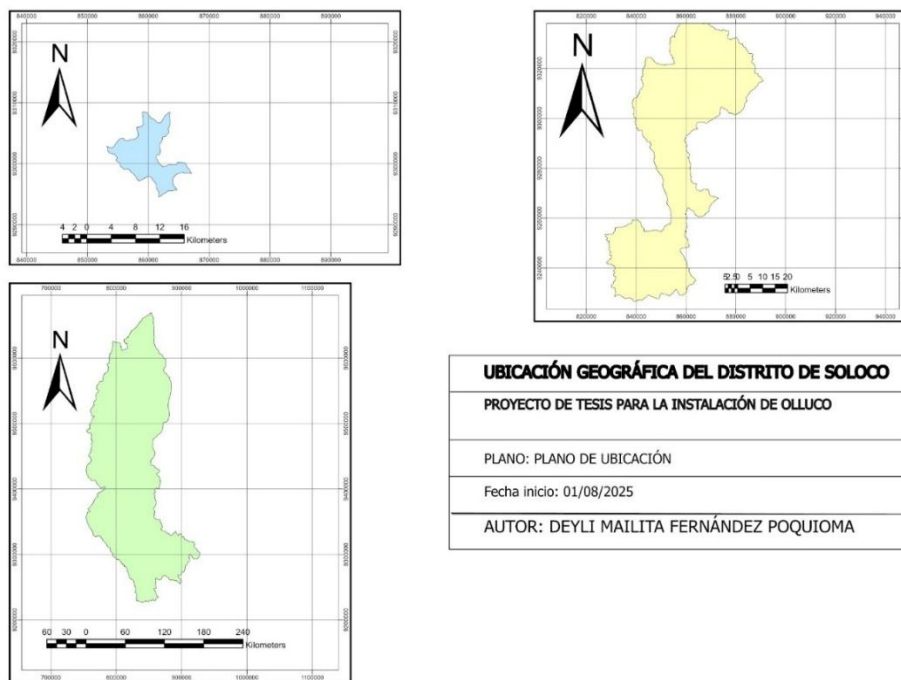


Figura 1. Ubicación geográfica de la investigación, anexo El Mito distrito de Soloco, provincia de Chachapoyas, departamento de Amazonas, Perú.

6.1.2. Población

Para esta investigación la población estará conformada por 10 accesiones de olluco representativos, provenientes de distintas zonas geográficas.

6.1.3. Muestra

La muestra estará conformada por 10 plantas por cada unidad experimental distribuidos en 4 bloques, teniendo en total 40 unidades experimentales.

6.1.4. Muestreo

Se empleará un muestreo no probabilístico.

6.2. Variable del estudio

6.2.1. Variable independiente

- 10 accesiones de olluco (*Ullucus tuberosus*)

6.2.2. Variable dependiente

a) Morfológicas y fenológicas

- Altura de planta
- Número de brotes por planta
- Color del tallo principal
- Color del follaje

- Color de flor
- Días al inicio de floración
- Días a la cosecha
- Número de tubérculos por planta
- Peso total de tubérculos por planta
- Rendimiento

b) Fisiológicos

- Contenido de clorofila
- Contenido de carotenoides
- Fotosíntesis neta
- Fluorescencia de la clorofila

c) Bioquímicos (en tubérculos)

- Contenido de almidón
- Azúcares totales
- Aminoácidos totales
- Proteína total
- Fenoles totales
- Perfil metabolómico: aminoácidos, azúcares y fenoles

d) Molecular

- Secuencia del genoma cloroplastidial

6.3. Métodos

6.3.1. Material de estudio

Tubérculo semilla de olluco

Este material vegetal será obtenido de diferentes zonas geográficas de la región Amazonas especialmente en las provincias con mayor proporción de tubérculos andinos.

Tabla 1. Procedencia de las 10 accesiones recolectadas de olluco (*Ullucus tuberosus*)

Tratamiento	Cod. De accesión	Lugar de colección
T1	UT - 001	Amazonas
T2	UT - 002	Amazonas
T3	UT - 003	Amazonas
T4	UT - 004	Amazonas
T5	UT - 005	Amazonas
T6	UT - 006	Amazonas
T7	UT - 007	Amazonas
T8	UT - 008	Amazonas
T9	UT - 009	Amazonas
T10	UT - 010	Amazonas
Total	10 accesiones	

6.3.2. Diseño de la investigación

En esta investigación se utilizará un diseño de bloques completamente al azar (DBCA), con 10 tratamientos, considerando cada accesión como un tratamiento, los cuales serán distribuidos en 4 bloques, con un total de 40 unidades experimentales.

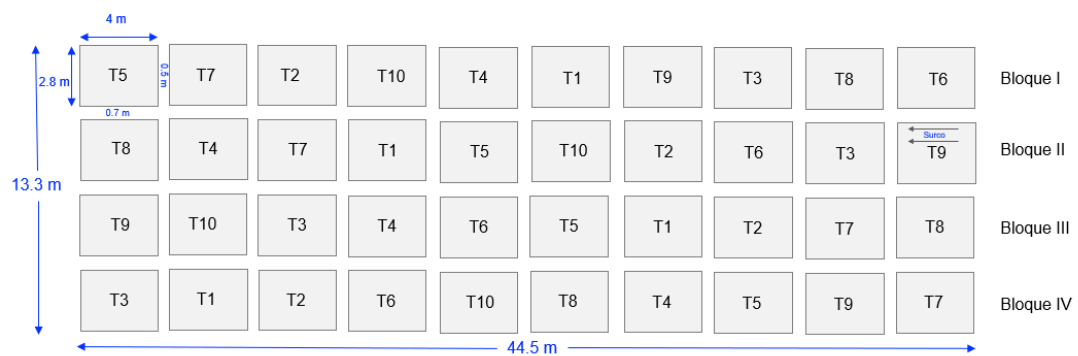


Figura 2. Croquis del campo experimental. Distribución de los tratamientos bajo un diseño de bloques completos al azar (DBCA).

Tabla 2. Dimensiones del campo experimental.

Área experimental	
Largo del área experimental	44.5 m
Ancho del área experimental	13.3 m
Área total del área experimental	591.85 m ²
Unidad experimental (UE)	
Número de UE	40
Largo de la UE	4 m
Ancho de la UE	2.8 m
Área neta de la UE	11.2 m
Bloques	
Número	4
Largo	44.5 m
Ancho	2.8 m
Distancia entre bloques	0.7 m
Surcos	
Número de surcos por UE	4
Largo	4 m
Distanciamiento entre surcos	0.70 m
Calles	
Ancho de las calles	0.70 m

Modelo aditivo lineal

El modelo aditivo lineal para un diseño de bloques completamente al azar (DBCA) con 10 tratamientos y 4 bloques se expresa de la siguiente manera:

Modelo:

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \beta_j + \varepsilon_{ij}$$

Donde:

Y_{ij} : Valor observado de la variable respuesta en el tratamiento i y bloque j

μ : Media general

τ_i : Efecto del tratamiento (accesión) i , para $i = 1, 2, \dots, 10$

β_j : Efecto del bloque j , para $j = 1, 2, 3, 4$

ε_{ij} : Error aleatorio asociado a la observación ij .

i : Identifica el tratamiento o accesión (en este caso son 10 accesiones, por lo tanto, $i = 1, 2, \dots, 10$)

j : Identifica el bloque o repetición (en este caso son 4 bloques, por lo tanto, $j = 1, 2, 3, 4$).

6.3.3. Establecimiento y manejo del cultivo

a) Análisis de suelo

Se realizará un análisis de suelo antes de la instalación del experimento, tomando una muestra compuesta a 30 cm de profundidad mediante el método en zigzag. Se recolectará aproximadamente 1 kg de suelo, luego será enviado al Laboratorio LABISAG de la Universidad Nacional Toribio Rodríguez Mendoza, la cual no permitirá conocer las condiciones edáficas del terreno.

b) Preparación del terreno:

El terreno seleccionado se ubica en el anexo El Mito distrito de Soloco, provincia de Chachapoyas. Las actividades de preparación del terreno consistirá en limpieza del campo, seguido del arado y rastrillado, para garantizar un suelo mullido y aireado, para el desarrollo del olluco (Steffanny Sanchez-Portillo et al., 2023). Finalmente, se confeccionarán los surcos.

c) Siembra

Los tubérculos serán sembrados de manera directa, en surcos. Se colocará un tubérculo por golpe, asegurando que presenten sus yemas visibles.

d) Fertilización

La fertilización estará dividida en dos etapas, la primera fertilización se realiza a los dos meses, aplicando la fórmula de fertilización 10-30-10 de NPK directamente en la corona de la planta y la segunda fertilización con la fórmula 8-20-20 de NPK, pero aplicado a chorro continuo (Barrera et al., 2004). La fertilización será ajustada en base a los resultados del análisis de suelo.

e) Deshierbe y aporque

Vimos N. et al. (1993) señalan lo importante que es mantener el campo libre de malezas y realizar de dos a tres aporques a lo largo del ciclo del cultivo según la necesidad observada del desarrollo del cultivo. Estas labores se realizarán con el uso de herramientas manuales como lampa y pico.

f) Riego

Suquilanda (2012) menciona que el requerimiento del cultivo, los riegos se deben aplicar cada 12 a 15 días hasta la floración y luego cada 8 a 10 días, que es cuando el cultivo requiere de mayor humedad para que se produzcan la formación de los tubérculos. En esta investigación el sistema de riego tecnificado no se implementará, porque se aprovechará el régimen de las lluvias de la zona. Teniendo en cuenta que en los meses de temporada de lluvias se va programar la siembra, logrando así adecuadamente los requerimientos hídricos para el cultivo de olluco.

g) Control fitosanitario

Consistirá en la aplicación de prácticas preventivas orientadas a reducir la incidencia de plagas y enfermedades durante el ciclo del cultivo. Se evaluará mediante un monitoreo visual, observando síntomas y signos en hojas, tallos y suelo, además de detectar presencia del insecto o el daño que hacen estos organismos dañinos como: gorgojos, áfidos, gusanos cortadores. López (2004) indica que, dentro de las labores culturales, una de las más relevantes es el control del gorgojo y de los gusanos cortadores, por lo que los agricultores recurren al uso de insecticidas como Furadán 4F, que se aplica entre una y tres veces por campaña.

h) Cosecha

La cosecha se realizará manualmente, una vez que las plantas presentan síntomas de senescencia como amarillamiento generalizado. La cosecha consistirá en escarbar cuidadosamente con herramientas manuales, para no dañar los tubérculos. Esta labor se realizará en días sin presencia de lluvias y en el tiempo oportuno para evitar que los tubérculos expuestos a los rayos solares tomen una coloración verde o negra, lo que les hace perder la calidad comercial.

6.3.4. Evaluación de variables

a) Evaluación de las variables morfológicas y fenológicas

- **Altura de planta**

La altura de planta será registrada en plena floración desde la base del tallo principal hasta la yema apical en 10 plantas por cada unidad experimental (IPGRI, 2003). De acuerdo a la altura, las accesiones serán clasificadas como:

- (1) Pequeña (<25 cm);
- (2) Intermedia (25 – 35 cm)
- (3) Alta (>35 cm)

- **Número de brotes por planta**

El número de brotes por planta serán registrados mediante un conteo visual el número de brotes de 10 plantas por cada unidad experimental.

- **Color de los tallos**

El color del tallo se evaluará mediante escalas de color estandarizadas como las propuestas por el (IPGRI, 2003).

- **Porte de la planta**

El porte de la planta será evaluado en 10 plantas por cada unidad experimental (IPGRI, 2003). Registrando si es:

- (1) Erecta
- (2) Rastrera

- **Forma de la lámina foliar**

Se evaluará la forma de la lámina foliar en 10 plantas representativas por unidad experimental (IPGRI, 2003), clasificando cada una como:

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

- **Color del follaje**

Con ayuda del descriptor de olluco se registrará el color de hojas de 10 plantas por unidad experimental (IPGRI, 2003), y se codificará como:

- (1) Verde amarillento claro
- (2) Verde amarillento
- (3) Verde amarillento oscuro

- **Hábito de floración**

En 10 plantas por unidad experimental se contará el número de flores abiertas (IPGRI, 2003), y se clasificará como:

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

- **Color de los sépalos**

El color de los sépalos se evaluará en flores recién abiertas de 10 plantas por unidad experimental usando el descriptor de oluco (IPGRI, 2003), registrando:

- (1) Verde amarillento
- (2) Púrpura rojizo claro
- (3) Púrpura rojizo

- **Color de los pétalos**

En las mismas flores se registrará el color de los pétalos (IPGRI, 2003), registrándose como:

- (1) Verde amarillento
- (2) Verde amarillento + ápice púrpura rojizo
- (3) Verde amarillento + ápice y bordes púrpura rojizo
- (4) Púrpura rojizo con fondo amarillo-naranja

- **Color predominante de la superficie de los tubérculos**

Tras limpiar 10 tubérculos por unidad experimental, se registrará el color predominante de la superficie de los tubérculos de acuerdo con el descriptor de oluco y se consignará la categoría 1-12 (1 = Verde amarillento ... 12 = Púrpura rojizo) (IPGRI, 2003).

- **Color secundario de la superficie de los tubérculos**

En los mismos tubérculos se registrará el color que cubra < 50 % de la superficie (IPGRI, 2003), codificándolo como:

- (0) Ausente

(1) Blanco amarillento

(2) Rojo pálido

(3) Púrpura rojizo

- **Forma del tubérculo**

La forma del tubérculo se registrará en 10 tubérculos por unidad experimental (IPGRI, 2003), y se clasificará como:

(1) Redondo

(2) Cilíndrico

(3) Semifalcado

(4) Retorcido

- **Color de la zona cortical**

Luego de cortar los tubérculos transversalmente, se comparará la zona cortical de acuerdo con el descriptor de olluco (IPGRI, 2003), y se codificará como:

(1) Verde amarillento

(2) Blanco amarillento

(3) Amarillo

(4) Naranja

(5) Naranja rojizo

(6) Rojo claro

(7) Rojo

(8) Púrpura rojizo

- **Color del cilindro central**

En la misma sección se observará el cilindro vascular (IPGRI, 2003), y se registrará como:

(1) Verde amarillento

(2) Blanco

(3) Blanco amarillento

(4) Amarillo

(5) Naranja amarillento

- **Número de tubérculos por planta**

El número de tubérculos por planta se evaluarán después de la cosecha, mediante conteo visual de 10 plantas por cada unidad experimental.

- **Peso de tubérculos por planta**

El peso de tubérculos por planta será registrado de 10 plantas por cada unidad experimental y serán clasificados (IPGRI/CIP, 2003):

1 Bajo (<0.7 Kg)

2 Intermedio (0.7 – 2.0 Kg)

3 Alto (>2.0 Kg)

- **Días a la floración**

Se contabilizarán los días desde la siembra hasta cuando haya florecido por lo menos el 50% de las plantas de cada unidad experimental, posteriormente serán clasificados (IPGRI/CIP, 2003):

0 ninguna floración

1 Floración temprana (<130 días)

2 Floración intermedia (130 – 150 días)

3 Floración tardía (>150 días)

- **Días a la cosecha**

Los días a la cosecha será registrado contabilizando los días desde la siembra hasta cuando entren en senescencia más del 50% de las plantas de cada unidad experimental (IPGRI/CIP, 2003).

b) Evaluación de las variables fisiológicos

- **Contenido de clorofilas**

Según López-Hidalgo et al. (2021) para la determinación del contenido de clorofilas, primero se realizará una extracción etanólica, se añade 1 mL de etanol frío al 80% (4 °C) a 5–10 mg de tejido seco (liofilizado y homogeneizado) o 50–70 mg de tejido fresco congelado previamente pulverizado en nitrógeno líquido. A continuación, la mezcla se centrifuga a 10 000 g durante 10 minutos a 4 °C. Finalmente se diluyen 300 µL del sobrenadante en una proporción 1:1 con etanol frío al 80% para el análisis de pigmentos fotosintéticos mediante espectrofotometría.

De acuerdo Lichtenthaler (1987) se cuantificará el contenido de clorofilas a y b, se transferirá 150 µL de la muestra oblanco (etanol al 80%) a una microplaca transparente de 96 pocillos. Luego se miden las absorbancias en un espectrofotómetro (lector de microplacas) a las longitudes de onda de 470, 649 y 664 nm. Los resultados serán expresados en µg/ml, utilizando las siguientes fórmulas:

$$\text{Clorofila a (Chl a)} (\mu\text{g/mL}) = 13.36 A_{664} - 5.19 A_{649}$$

$$\text{Clorofila b (Chl b)} (\mu\text{g/mL}) = 27.43 A_{649} - 8.12 A_{664}$$

- **Contenido de carotenoides**

Para evaluar el contenido de carotenoides totales se utilizará la siguiente fórmula (Lichtenthaler, 1987).:

$$\text{Carotenoides } (\mu\text{g/mL}) = (1000 A_{470} - 2.13 \text{ Chl a} - 97.63 \text{ Chl b})/209$$

- **Fotosíntesis neta**

La fotosíntesis neta será determinado simultáneamente con las mediciones de fluorescencia de clorofila siguiendo la metodología descrita anteriormente (Medeiros et al., 2017). Para ello, se empleará un sistema portátil de fotosíntesis (LI-6800; LI-COR Inc., Lincoln, NE, EE. UU.) equipado con una cámara de fluorescencia integrada (6800-01A; LI-COR Inc.). El análisis de intercambio de gases instantáneo se medirá después de 1 hora de exposición a una luz de 1000 µmol de fotones m⁻²s⁻¹, manteniendo una concentración de CO₂ de referencia se establecerá en 400 µmol de CO₂ mol⁻¹ de aire. Adicional a la evaluación de la fotosíntesis neta (A_N), también se evaluará la conductancia estomática (g_s), la tasa de transpiración (E), la concentración interna de CO₂ (C_i) y se calculará la eficiencia del uso de agua (WUE = A_N/g_s).

- **Fluorescencia de la clorofila**

La emisión de fluorescencia inicial (F₀) se determinará aplicando iluminando hojas adaptadas a la oscuridad con un haz de medición modulado débil (0.03 µmol de fotones m⁻²s⁻¹). Para obtener la

fluorescencia máxima (Fm) se aplicará un pulso de luz blanca saturada ($8000 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) con una duración de 0.8 s. Además, se calcularán otros parámetros que se encuentren relacionados a la fluorescencia de Chl como se describió previamente (Genty et al., 1989; Logan et al., 2007), incluyendo las relaciones Fv/Fm y Fv'/Fm', la disipación no fotoquímica (NPQ), la disipación fotoquímica (qP), la eficiencia fotoquímica del fotosistema II (ϕPSII) y la tasa de transferencia de electrones (ETR).

c) Evaluación de los parámetros bioquímicos (en tubérculos)

- **Contenido de almidón**

El contenido de almidón de los tubérculos de olluco se determinará mediante el método de la antrona, de acuerdo con la metodología descrita por Chow & Landhäusser (2004).

- **Azúcares totales**

El contenido de azúcares totales de los tubérculos de olluco se determinará mediante el método de la antrona, según la metodología reportada por Chow & Landhausser (2004).

- **Aminoácidos totales**

Los aminoácidos totales de los tubérculos de olluco se determinará mediante el método de la ninhidrina, de acuerdo con el protocolo establecido por Yemm et al. (1955).

- **Proteína total**

El contenido de proteínas totales de los tubérculos de olluco se realizará mediante el procedimiento establecido por Bradford (1976).

- **Fenoles totales**

Los fenoles totales se determinarán utilizando el reactivo Folin–Ciocalteu como lo describen Ainsworth & Gillespie (2007).

- **Perfil de aminoácidos**

La cuantificación de aminoácidos se realizará de acuerdo a lo reportado previamente por Balcázar-Zumaeta et al. (2024), mediante cromatografía líquida de ultra alta resolución (UHPLC):

Preparación de la muestra: Se procesará 1 g de muestra con ácido tricloroacético al 15%, seguido de centrifugación a 11 800 rpm durante 10 min a 4 °C, luego se filtrarán 1.5 µL del sobrenadante mediante un filtro de Nylon de 0.22 µm (Merck, Millex, Alemania).

Configuración del sistema UHPLC: La separación y cuantificación se determinará en un equipo UHPLC (Agilent Technologies Infinity II, Waldbronn, Alemania), equipado con:

Muestreador múltiple (G7167B)

- Bomba flexible (G7104A)
- Horno de columna (G7116B)
- Detector de matriz de diodos (G7117B)
- La separación se realizará con una columna Zorbax Eclipse-AAA de 4.6 × 150 mm, 3.5.

Derivatización y condiciones de separación:

Derivatización: OPA (orto-ftalaldehído) para aminoácidos primarios, FMOC (9-fluorenil metil cloroformiato) para aminoácidos secundarios y Tampón borato (0.4 mol L⁻¹, pH 10.2) (Agilent PN 5061–3339).

Fases móviles: La fase A: NaH₂PO₄ (5.5 g/L) en agua ultrapura (pH 7.8) y la fase B: mezcla de solución de acetonitrilo ACN-metanol - MeOH-agua (45:45:10). Ambas fases se filtrarán con membranas Millex LCR 0.22 µm.

Estándares: Se utilizará una mezcla de estándares de aminoácidos y se disolverá en 25 mL con HCl (0.1 N) para su identificación. Parámetros cromatográficos: Un Caudal de 2 mL/min, el tiempo de duración de inyección es 16 min y la temperatura de columna es 40 °C.

Análisis de datos: La cuantificación se realizará comparando las áreas de los picos de la muestra con los estándares mediante

el software ChemStation (OpenLAB) y los resultados se expresarán en mg de aminoácido/100 g de muestra.

- **Perfil de azúcares**

La cuantificación de azúcares por HPLC se realizará de acuerdo a lo reportado por Alghamdi et al.(2020), el cual consiste:

Preparación de la muestra:

1. Se disolverá 1 g de muestra en 10 mL de agua.
2. Se someterá a ultrasonido a 60 °C durante 30 min.
3. Se centrifugará a 3 000 rpm, 4 °C, por 15 min.
4. El sobrenadante se filtrará con un filtro Milpore de 0.45 µm antes del análisis por HPLC.

Condiciones del HPLC:

- Columna: Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18
- Fase móvil: Acetonitrilo al 20%
- Flujo: 1.5 mL/min
- Temperatura de columna: 27 °C

Calibración con Estándares: Se preparará una solución madre con 200 mg de sacarosa, fructosa y glucosa en 10 mL de agua. A partir de esta, se generará una curva de calibración con diferentes concentraciones.

Análisis: La identificación y cuantificación se basará en los tiempos de retención y áreas de los picos comparados con los estándares.

- **Perfil de compuestos fenólicos**

La cuantificación de fenoles se realizará de acuerdo a lo reportado por Zhang et al. (2024), mediante cromatografía líquida de ultra alta resolución (UHPLC), el cual consiste:

Preparación de la muestra:

- Se homogeneizarán 50 mg aproximadamente de muestra en 1.2 mL de metanol al 70%.

- La mezcla se agitará intermitentemente (6 veces, cada 30 minutos)
- Posteriormente, se centrifugará a 12,000 rpm durante 3 minutos.
- El sobrenadante se filtrará mediante membrana microporosa de 0.22 μm antes del análisis
- Luego se coloca en un vial de inyección para el análisis.

Condiciones cromatográficas: La columna será una columna Agilent SB-C18.

Fases móviles: La fase A tendrá agua ultrapura que contenía 0.1% ácido fórmico mientras que la fase B será acetonitrilo con 0.1% ácido fórmico.

Gradiente de elución:

- 0-9 min: gradiente lineal de 5% a 95% B
- 10-11 min: 95% a 5% B
- 12-14 min: equilibrio a 5% B

Parámetros instrumentales:

- Volumen de inyección de la muestra: 4 μL
- Temperatura de columna: 40°C
- Caudal: 0.35 mL/min

Análisis de datos: Los compuestos fenólicos se identificarán y cuantificarán los principales fenoles en la muestra.

- Se empleará un kit de fenoles (Merck)
- Comparación de las áreas de los picos de la muestra con cada pico estándar utilizando el software de control ChemStation (OpenLAB).

d) Evaluación de las características moleculares

- **Extracción de ADN**

Aislamiento del ADN:

- Se empleará el protocolo CTAB para la extracción del ADN total.

- La pureza del ADN se determinará espectrofotométricamente con un nanodrop.

Cuantificación y control de calidad:

- La concentración de ADN se medirá con fluorómetro Qubit.
- Se utilizará el kit de ensayo Qubit™ dsDNA BR (Invitrogen, Carlsbad, NM, EE. UU.).
- La calidad del ADN se evaluará mediante electroforesis en gel.

Enriquecimiento de ADN cloroplastídico: Dado que el ADN genómico total contiene solo un 5 % de ADN plastídico, para enriquecer esta fracción se utilizará un kit de enriquecimiento de ADN microbiano (NEB), lo cual es fundamental para obtener una cobertura profunda y generar ensamblajes de alta calidad de genomas de organelos.

- **Preparación de librería y secuenciación**

Preparación de bibliotecas:

- Se empleará el kit SQK-LSK114 de Oxford Nanopore Technologies (ONT) para ligación y preparación de bibliotecas lecturas largas.
- Se utilizará adicionalmente el módulo NEBNext® complementario para Oxford Nanopore Technologies®; secuenciación de ligadura (NEB).

Secuenciación: Las 10 accesiones de olluco se analizarán en el secuenciador PromethION P2 Solo. Se usará la celda de flujo R10.4.1 para la generación de datos.

Procesamiento de datos:

- Las lecturas brutas generadas se procesarán con duplex_tools 0.2.20 (ONT) para generar pares de lecturas dúplex y alcanzar calidades de secuencia superiores a Q30.
- El llamado de bases se realizará con el software Dorado 0.1.1 (ONT) con un modelo de súper precisión (SUP) y modo estéreo-dúplex.

- **Ensamblaje y anotación del genoma cloroplastidial**

Las lecturas de secuenciación se ensamblarán en contigs utilizando Flye 2.91 (Kolmogorov et al., 2019) con el indicador - meta y una superposición mínima establecida en 2000 pb. Los contigs ensamblados se mapearán a genomas de referencia existentes utilizando minimap2 (Li, 2018). Los borradores de genomas se circularizarán y reasignarán utilizando minimap2 para corregir posibles errores y calcular la cobertura media. Finalmente, los genomas corregidos se anotarán utilizando datos de plastomas previamente secuenciados, utilizando Geneious Prime 2023.

- **Variantes estructurales y detección de SNP**

El análisis de la presencia de variantes estructurales en los plastomas de los ollucos analizadas se realizará empleando el pipeline Cp-Hap (Wang & Lanfear, 2019). Para cada uno de los plastomas ensamblados, se preparará un archivo fasto que incluya las regiones LSC, SSC e IR. Los archivos de mapeo BAM de la etapa de ensamblaje se utilizarán para identificar SNP mediante CLAIR3 v.1.0.0 (Zheng et al., 2022) y el modelo r1041_e82_400bps_sup_v400 con los siguientes parámetros: -t = 120, -p - min_coverage = 50, -enable_long_indel. Dado que las tecnologías de lectura larga son propensas a errores de delección, especialmente en regiones homopoliméricas, las variantes anotadas de este tipo se eliminarán de los análisis posteriores. Finalmente, la distribución de SNP heteroplásmicos se visualizará mediante Circos (Krzywinski et al., 2009).

6.3.5. Cronograma

Tabla 3: *Cronograma de ejecución de la investigación*

Actividades	2025											
	Ag.25	Set.25	Oct.25	Nov.25	Dic.25	Ene.26	Feb.26	Mar.26	Abr.26	May.26	Jun.26	Jul.26
Preparación del terreno y análisis del suelo	X	X										
Siembra de tubérculos		X										
Manejo agronómico del cultivo		X	X	X								
Evaluación de variables morfológicas y fenológicas			X	X	X							
Evaluación fisiológica en campo				X	X	X						
Cosecha y evaluación productiva						X						
Análisis bioquímico de tubérculos en laboratorio						X	X					
Análisis molecular (ADN cloroplastidial, PCR y filogenia)							X	X				
Procesamiento de datos y análisis estadístico								X	X			
Elaboración de informe										X		
Levantamiento de observaciones											X	
Sustentación de la tesis												
Total	12 meses											

6.4. Análisis de datos

Los datos obtenidos serán sometidos a un análisis de varianza (ANOVA), y en caso de encontrar diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los tratamientos, se aplicará la prueba de comparación de medias de Tukey. Previamente se verificará la normalidad y homogeneidad de varianzas. Además, se empleará análisis multivariado como componentes principales (ACP) y análisis de conglomerados para explorar la variabilidad fenotípica entre accesiones. Todos los análisis se realizarán utilizando el software estadístico R.

7. Referencias bibliográficas

- Ainsworth, E. A., & Gillespie, K. M. (2007). Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin–Ciocalteu reagent. *Nature Protocols*, 2(4), 875-877. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.102>
- Alghamdi, B. A., Alshumrani, E. S., Saeed, M. S. B., Rawas, G. M., Alharthi, N. T., Baeshen, M. N., Helmi, N. M., Alam, M. Z., & Suhail, M. (2020). Analysis of sugar composition and pesticides using HPLC and GC–MS techniques in honey samples collected from Saudi Arabian markets. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 27(12), 3720-3726. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.08.018>
- Balcázar-Zumaeta, C. R., Fernández-Romero, E., Lopes, A. S., Ferreira, N. R., Chagas-Júnior, G. C. A., Yoplac, I., López-Trigoso, H. A., Tuesta-Occ, M. L., Maldonado-Ramirez, I., Maicelo-Quintana, J. L., Cayo-Colca, I. S., & Castro-Alayo, E. M. (2024). Amino acid profile behavior during the fermentation of Criollo cocoa beans. *Food Chemistry: X*, 22, 101486. <https://doi.org/10.1016/j.fochx.2024.101486>
- Barrera, V. H., Espinosa A., P., Tapia B., C., Monteros, A., & Valverde, F. (2004). *Caracterización de las raíces y los tubérculos andinos en la ecoregión andina del Ecuador*. Quito, EC: INIAP/CIP/COSUDE, 2004. <http://repositorio.iniap.gob.ec/handle/41000/3261>
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1), 248-254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Campos, D., Chirinos, R., Gálvez Ranilla, L., & Pedreschi, R. (2018). Chapter Eight—Bioactive Potential of Andean Fruits, Seeds, and Tubers. En F. Toldrá (Ed.), *Advances in Food and Nutrition Research* (Vol. 84, pp. 287-343). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/bs.afnr.2017.12.005>
- Campos, D., Noratto, G., Chirinos, R., Arbizu, C., Roca, W., & Cisneros-Zevallos, L. (2006). Antioxidant capacity and secondary metabolites in four species of Andean tuber crops: Native potato (*Solanum* sp.), mashua (*Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pavón), Oca

- (*Oxalis tuberosa* Molina) and ulluco (*Ullucus tuberosus* Caldas). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86(10), 1481-1488. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2529>
- Cejudo-Bastante, M. J., Hurtado, N., Mosquera, N., & Heredia, F. J. (2014). Uso potencial de nuevas fuentes colombianas de betalaínas. Estabilidad del color de extractos de ulluco (*Ulluco tuberosus*) en diferentes condiciones de pH y temperatura. *Food Research International*, 64, 465-471. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.07.036>
- Chow, P. S., & Landhäusser, S. M. (2004). A method for routine measurements of total sugar and starch content in woody plant tissues. *Tree Physiology*, 24(10), 1129-1136. <https://doi.org/10.1093/treephys/24.10.1129>
- Chow, P. S., & Landhausser, S. M. (2004). A method for routine measurements of total sugar and starch content in woody plant tissues. *Tree Physiology*, 24(10), 1129-1136. <https://doi.org/10.1093/treephys/24.10.1129>
- Flores-Marquez, R., Vera-Vílchez, J., Verástegui-Martínez, P., Lastra, S., & Solórzano-Acosta, R. (2024). An Evaluation of Dryland Ulluco Cultivation Yields in the Face of Climate Change Scenarios in the Central Andes of Peru by Using the AquaCrop Model. *Sustainability*, 16(13), Article 13. <https://doi.org/10.3390/su16135428>
- Fox, A., Fowkes, A. R., Skelton, A., Harju, V., Buxton-Kirk, A., Kelly, M., Forde, S. M. D., Pufal, H., Conyers, C., Ward, R., Weekes, R., Boonham, N., & Adams, I. P. (2019). Using high-throughput sequencing in support of a plant health outbreak reveals novel viruses in *Ullucus tuberosus* (Basellaceae). *Plant Pathology*, 68(3), 576-587. <https://doi.org/10.1111/ppa.12962>
- Genty, B., Briantais, J.-M., & Baker, N. R. (1989). The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 990(1), 87-92. [https://doi.org/10.1016/S0304-4165\(89\)80016-9](https://doi.org/10.1016/S0304-4165(89)80016-9)
- Health (PLH), E. P. on P., Bragard, C., Dehnen-Schmutz, K., Di Serio, F., Gonthier, P., Jacques, M.-A., Jaques Miret, J. A., Justesen, A. F., MacLeod, A., Magnusson, C. S., Milonas, P., Navas-Cortes, J. A., Parnell, S., Potting, R., Reignault, P. L., Thulke, H.-H., Van der

- Werf, W., Vicent Civera, A., Zappalà, L., ... Yuen, J. (2021). Commodity risk assessment of *Ullucus tuberosus* tubers from Peru. *EFSA Journal*, 19(3), e06428. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2021.6428>
- Hernández. (2023). *Diversidad y distribución de tubérculos andinos (Solanum tuberosum, Oxalis tuberosa, Ullucus tuberosus y Tropaeolum tuberosum): Un análisis agrogeográfico* / *Revista investigaciones y estudios - UNA*. <https://revistascientificas.una.py/index.php/rdgic/article/view/3312>
- IPGRI. (2003). *Descriptores del ulluco: Ullucus tuberosus*. IPGRI [etc.
- King, S. R., & Gershoff, S. N. (1987). Nutritional evaluation of three underexploited andean tubers: *Oxalis tuberosa* (Oxalidaceae), *Ullucus tuberosus* (Basellaceae), and *Tropaeolum tuberosum* (Tropaeolaceae). *Economic Botany*, 41(4), 503-511. <https://doi.org/10.1007/BF02908144>
- Kolmogorov, M., Yuan, J., Lin, Y., & Pevzner, P. A. (2019). Assembly of long, error-prone reads using repeat graphs. *Nature Biotechnology*, 37(5), 540-546. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0072-8>
- Krzywinski, M., Schein, J., Birol, Í., Connors, J., Gascoyne, R., Horsman, D., Jones, S. J., & Marra, M. A. (2009). Circos: An information aesthetic for comparative genomics. *Genome Research*, 19(9), 1639-1645. <https://doi.org/10.1101/gr.092759.109>
- Li, H. (2018). Minimap2: Pairwise alignment for nucleotide sequences. *Bioinformatics*, 34(18), 3094-3100. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty191>
- Lichtenthaler, H. K. (1987). [34] Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. En *Methods in Enzymology* (Vol. 148, pp. 350-382). Academic Press. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(87\)48036-1](https://doi.org/10.1016/0076-6879(87)48036-1)
- Logan, B. A., Adams, W. W., & Demmig-Adams, B. (2007). Viewpoint: Avoiding common pitfalls of chlorophyll fluorescence analysis under field conditions. *Functional Plant Biology*, 34(9), 853. <https://doi.org/10.1071/FP07113>
- López, G. (2004). *El cultivo del ulluco en la sierra central del Perú*. CIP.

- Malice, M., Bizoux, J. P., Blas, R., & Baudoin, J. P. (2010). Genetic Diversity of Andean Tuber Crop Species in the in situ Microcenter of Huanuco, Peru. *Crop Science*, 50(5), 1915-1923. <https://doi.org/10.2135/cropsci2009.09.0476>
- Mancheno, H. J. B., & Peralta, D. G. Q. (2011). *Utilización de harina de Ullucus tuberosus en la elaboración de pan*.
- Medeiros, D. B., Barros, K. A., Barros, J. A. S., Omena-Garcia, R. P., Arrivault, S., Sanglard, L. M. V. P., Detmann, K. C., Silva, W. B., Daloso, D. M., DaMatta, F. M., Nunes-Nesi, A., Fernie, A. R., & Araújo, W. L. (2017). Impaired Malate and Fumarate Accumulation Due to the Mutation of the Tonoplast Dicarboxylate Transporter Has Little Effects on Stomatal Behavior. *Plant Physiology*, 175(3), 1068-1081. <https://doi.org/10.1104/pp.17.00971>
- Naranjo Quinaluisa, E. J., Tapia Bastidas, C. G., Velázquez Feria, R. J., Cruz Pérez, Y., Delgado Pilla, A. H., Borja Borja, E. J., & Paredes Andrade, N. J. (2018). Caracterización Eco-geográfica de melloco (*Ullucus tuberosus* C.) En la Región Alto Andina del Ecuador. *La Técnica: Revista de las Agrociencias*. ISSN 2477-8982, 19, 31. https://doi.org/10.33936/la_tecnica.v0i19.953
- Parra-Quijano, M., Panda, S., Rodríguez, N., & Torres, E. (2012). Diversity of *Ullucus tuberosus* (Basellaceae) in the Colombian Andes and notes on ulluco domestication based on morphological and molecular data. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 59(1), 49-66. <https://doi.org/10.1007/s10722-011-9667-8>
- Pérez-Escobar, O. A., Zizka, A., Bermúdez, M. A., Meseguer, A. S., Condamine, F. L., Hoorn, C., Hooghiemstra, H., Pu, Y., Bogarín, D., Boschman, L. M., Pennington, R. T., Antonelli, A., & Chomicki, G. (2022). The Andes through time: Evolution and distribution of Andean floras. *Trends in Plant Science*, 27(4), 364-378. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2021.09.010>
- Pickersgill, B. (2007). Domestication of Plants in the Americas: Insights from Mendelian and Molecular Genetics. *Annals of Botany*, 100(5), 925-940. <https://doi.org/10.1093/aob/mcm193>

- Romero-Carpio, M., & Estrada-Jiménez, R. (2005). Selección de fragmentos diferenciales de ADNc relacionados con estrés hídrico en *Ullucus tuberosus* Loz. (Bassellaceae) «olluco» (*). *Revista Peruana de Biología*, 12(1), Article 1. <https://doi.org/10.15381/rpb.v12i1.2367>
- Siqueira, M. V. B. M., do Nascimento, W. F., Pereira, D. A., Cruz, J. G., Vendrame, L. P. de C., & Veasey, E. A. (2023). Chapter 2—Origin, domestication, and evolution of underground starchy crops of South America. En M. Pascoli Cereda & O. François Vilpoux (Eds.), *Starchy Crops Morphology, Extraction, Properties and Applications* (pp. 17-42). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-90058-4.00011-6>
- Steffanny Sanchez-Portillo, Salazar Sánchez, M. D. R., Solanilla-Duque, J. F., & Rodríguez Herrera, R. (2023). Andean Tubers, Morphological Diversity, and Agronomic Management: A Review. *Plant Science Today*. <https://doi.org/10.14719/pst.2504>
- Suquilanda, F. (2012). *PRODUCCIÓN ORGÁNICA DE CULTIVOS ANDINOS*.
- Valcárcel-Yamani, B., Rondán-Sanabria, G. G., & Finardi-Filho, F. (2013). The physical, chemical and functional characterization of starches from Andean tubers: Oca (*Oxalis tuberosa* Molina), olluco (*Ullucus tuberosus* Caldas) and mashua (*Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pavón). *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 49, 453-464. <https://doi.org/10.1590/S1984-82502013000300007>
- Vimos N., C., Nieto C., C., & Rivera M., M. (1993). *El melloco, características técnicas de cultivo y potencial en el Ecuador*. <http://repositorio.iniap.gob.ec/handle/41000/2693>
- Wang, W., & Lanfear, R. (2019). Long-Reads Reveal That the Chloroplast Genome Exists in Two Distinct Versions in Most Plants. *Genome Biology and Evolution*, 11(12), 3372-3381. <https://doi.org/10.1093/gbe/evz256>
- Yemm, E. W., Cocking, E. C., & Ricketts, R. E. (1955). The determination of amino-acids with ninhydrin. *The Analyst*, 80(948), 209. <https://doi.org/10.1039/an9558000209>
- Zepner, L., Karrasch, Pierre, Wiemann, Felix, & Bernard, L. (2021). ClimateCharts.net – an interactive climate analysis web platform. *International Journal of Digital Earth*, 14(3), 338-356. <https://doi.org/10.1080/17538947.2020.1829112>

- Zhang, L., Dang, B., Lan, Y., Zheng, W., Kuang, J., Zhang, J., & Zhang, W. (2024). Metabolomics Characterization of Phenolic Compounds in Colored Quinoa and Their Relationship with In Vitro Antioxidant and Hypoglycemic Activities. *Molecules*, 29(7), Article 7. <https://doi.org/10.3390/molecules29071509>
- Zheng, Z., Li, S., Su, J., Leung, A. W.-S., Lam, T.-W., & Luo, R. (2022). Symphonizing pileup and full-alignment for deep learning-based long-read variant calling. *Nature Computational Science*, 2(12), 797-803. <https://doi.org/10.1038/s43588-022-00387-x>
- Zimmerer, K. S. (2003). Just small potatoes (and ulluco)? The use of seed-size variation in “native commercialized” agriculture and agrobiodiversity conservation among Peruvian farmers. *Agriculture and Human Values*, 20(2), 107-123. <https://doi.org/10.1023/A:1024097008693>