

UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE

Facultad de Ciencias Agrarias

Escuela de Agronomía

Evaluación de la diversidad genética de papas nativas (*Solanum tuberosum* L.ssp. *tuberosum* Hawkes) silvestres y cultivadas del sur de Chile, mediante el uso de marcadores microsatélites

Tesis presentada como parte de los requisitos para optar al grado de Licenciado en Agronomía.
Profesor Patrocinante : Sr. Ricardo Riegel Sch. - Ing. Agr., M. Agr., Dr. Rer. Sylv. -
Instituto de Producción y Sanidad Vegetal.

José Ricardo Pérez Díaz

Valdivia Chile 2004

Contenido

Profesores Informantes . .	1
RESUMEN .	3
SUMMARY .	4
1. INTRODUCCION .	7
2. REVISION BIBLIOGRAFICA . .	9
2.1. Antecedentes de la papa cultivada .	9
2.2. Germoplasma Chileno de Papas y estudios de clasificación .	13
2.3. Marcadores moleculares .	14
3. MATERIAL Y METODO . .	21
3.1. Material .	21
3.2. Método .	23
4. PRESENTACION Y DISCUSION DE RESULTADOS . .	29
4.1. Amplificación de secuencias microsatélites . .	29
4.2. Caracterización molecular de las accesiones de papa .	30
4.3. Distancias genéticas .	39
5. CONCLUSIONES . .	49
BIBLIOGRAFIA .	51
ANEXOS .	57
Anexo 1. Variedades típicamente chilotas. . .	57
Anexo 2. Accesiones de papas nativas del grupo colección. .	58
Anexo 3. Accesiones colectadas en el Archipiélago de los Chonos. .	61
Anexo 4. Variedades antiguas europeas. . .	62
Anexo 5. Distancias genéticas entre variedades chilotas, accesiones de los Chonos y variedades antiguas europeas. . .	63
Anexo 6. Distancias genéticas entre variedades típicamente chilotas. .	66
Anexo 7. Distancias genéticas entre accesiones silvestres de papas colectadas en el Archipiélago de los Chonos. .	67

Profesores Informantes

Sr. Andrés Contreras M. - Ing. Agr. - Instituto de Producción y Sanidad Vegetal.

Sra. Laura Böhm S. - Ing. Agr. - Instituto de Producción y Sanidad Vegetal.

RESUMEN

La zona sur de Chile es considerada subcentro de origen de la papa cultivada a nivel mundial, motivo por el cual en el Banco genético de la Universidad Austral de Chile se conservan accesiones de la forma cultivada *Solanum tuberosum* L. ssp. *tuberosum* Hawkes. Estos individuos provienen de colectas realizadas principalmente en la Isla de Chiloé y Archipiélago de los Chonos.

El material colectado ya ha sido caracterizado morfológicamente y con técnicas electroforéticas, con la finalidad de eliminar duplicados, sin embargo, no ha sido estudiada a nivel molecular (secuencias de ADN). El objetivo principal de esta tesis fue determinar la diversidad genética de las papas nativas que se cultivan y crecen en el sur de Chile y sus relaciones de parentesco.

Mediante siete marcadores del tipo microsatélites del núcleo (SSRs), fueron analizadas 249 accesiones de *Solanum tuberosum* ssp. *tuberosum* nativas del sur de Chile, las que fueron agrupadas según su origen e información disponible en tres grupos: Chiloé(n=41), constituido por variedades típicamente chilotas; Chonos(n=11), con material silvestre colectado en el Archipiélago de los Chonos, y Colección(n=197), formado por accesiones distintas a Chonos y variedades típicamente chilotas, colectadas en la Isla de Chiloé y otros lugares del sur de Chile. Como referencia se utilizó el grupo Europeas(n=24), con cultivares antiguos europeos.

En el material nativo del sur de Chile se detectaron en promedio 9,86 alelos/locus. Para Colección se detectaron 9,29 alelos/locus, seguido por Chiloé con 7,71 alelos, Chonos con 6,29 y Europeas con 5,7 alelos/locus. El grupo que presentó la mayor

diversidad genética fue Chonos (0,82), seguido de Chiloé (0,78), Colección (0,74) y Europeas (0,74).

Esta alta diversidad del material chileno fue acompañada de un alto porcentaje de individuos heterocigotos (88%) con índices de heterocigosidad de 0,52 en Chiloé a 0,46 en Chonos. Las distancias genéticas entre grupos fueron muy bajas, siendo la mayor entre el grupo Chiloé y Europeas (0,01), poniendo de manifiesto el alto parentesco de las papas nativas del sur de Chile con las variedades antiguas europeas.

Mediante la visualización de las distancias genéticas en forma de dendrogramas y coordenadas principales para todas las accesiones estudiadas, se determinó que se formaron grupos pero independientes del origen geográfico en que se colectaron las muestras.

La genotipización permitió determinar que el 99,2% del material nativo presenta un patrón genético único, lo que permite inferir que el número de duplicados es muy bajo.

El gran número de alelos encontrado en las papas nativas de Chile, dentro de los cuales un alto porcentaje no estuvieron presentes en las variedades europeas, y a los valores de diversidad genética encontrados, revelan el gran valor que presenta el banco de germoplasma de papas mantenido en la Universidad Austral de Chile. Se espera que los conocimientos generados en relación a la base genética de las papas nativas de Chile, contribuyan a hacer de este valioso material un mayor y mejor uso por parte de los fitomejoradores, aprovechando así el potencial genético que presentan para el mejoramiento del cultivo.

SUMMARY

Southern Chile is considered a subcenter of the origin of cultivated potatoes in the world, for that reason in the gene bank of the Universidad Austral de Chile, accessions of the cultivated species *Solanum tuberosum* ssp. *tuberosum* Hawkes are conserved. This material was collected in Chiloé Island, the Chonos Archipelago and the adjacent areas in south-central mainland Chile.

These accessions have been morphologic and electroforetically characterized through protein and esterase techniques to eliminate duplicates. However, their molecular level (DNA sequence) has not been yet studied. The main objective was to determinate the genetic diversity in wild and cultivated potatoes that grow in southern Chile, and the relationships between them.

Two hundred and forty nine chilean native accessions of *S. tuberosum* ssp. *tuberosum* were analyzed by seven nuclear microsatellites markers (SSRs). These were previously gathered in three groups accord to origin and available information: "Chiloé" (n=41) conformed by typically Chiloé Island varieties, "Chonos" (n=11) with wild accessions collected in Chonos Archipelago and "Colección" (n=197) with material different to Chonos and Chiloé collected in southern Chile. As reference 23 old european varieties were used.

By means the genotyping were assessed that the 99,2% of the native potatoes of Chile presented an unique genetic pattern, and it permits to conclude that the number of duplicates is very low.

This native material presented an average of 9,8 alleles/locus. In the "Colección" was detected 9,29 alleles/locus, followed by "Chiloé" with 7,71 alleles, "Chonos" with 6,29 and "Europeas" with 5,7 alleles/locus. The group that presented the highest genetic diversity was "Chonos" (0,82), then "Chiloé"(0,78), "Colección" (0,74) and "Europeas" (0 74).

The large diversity of chilean potatoes was associated with a high percentage of heterozygous individuals (88%), with a *Heterozygosity Index* of 0,52 in "Chiloé" to 0,46 in "Chonos". The groups are closely related, appearing the greater distance between "Chiloé" and "Europeas" groups(0,01 value). This is an evidence of the high level of kinship between chilean and old european varieties. The genetic distance was visualized by means of dendrograms and principal coordinates analysis. Relation between the phylogenetic groups and geographic origin in which the plants were collected, was not found.

The presence of high allelic diversity in chilean native potatoes and an important number of unique alleles or exclusives that were not present in old european varieties, added to the high levels of genetic diversity found in this material, evidence the great value of the potato germplasm bank maintained in the Universidad Austral de Chile. It is expected that the knowledge obtained in this work about genetic base of the chilean potato germplasm, contribute to make a greater and better use of this valuable genetic material by plant breeders, taking advantage of the genetic potential that present these to genetic improvement of cultivated potato.

1. INTRODUCCION

La zona sur de Chile es considerada como subcentro de origen de la papa cultivada *Solanum tuberosum* L. ssp. *tuberosum* Hawkes. Es por este motivo que investigadores de la Universidad Austral de Chile se han preocupado desde hace años por coleccionar, mantener y evaluar material nativo silvestre y cultivado de papas, logrando formar el Banco de Germoplasma Chileno de Papas.

Debido a la gran cantidad de material coleccionado y a la dificultosa mantención que esto acarrea, se hizo necesario establecer métodos para eliminar aquel material que correspondiese a duplicados, esto se realizó mediante pautas de clasificación morfológica y posteriormente utilizando nuevas técnicas, como la electroforesis de proteínas y esterasas.

Muchas veces debido al desconocimiento que se tiene de la organización genética de un banco de genes, y a las relaciones existentes entre el material coleccionado, se hace dificultoso su uso en programas de mejoramiento.

Mediante la utilización de técnicas moleculares basadas en el estudio de las variaciones de la molécula del ácido desoxirribonucleico (ADN), los marcadores moleculares se presentan como una poderosa herramienta para el estudio del material genético de las papas nativas de Chile. Una de estas técnicas, que se basa en la reacción de la polimerasa en cadena (PCR) y que permite la amplificación de secuencias de nucleótidos repetitivos y altamente conservados en el genoma, son los microsatélites. Este tipo de marcadores presentan la ventaja de ser altamente polimórficos y distinguir entre individuos homocigotos y heterocigotos, además de haber sido ya desarrollados en

S. tuberosum. Estas características los hace muy útiles para estimar la diversidad alelica dentro de la colección chilena de papas.

La hipótesis planteada en este trabajo es que la especie *S. tuberosum* ssp. *tuberosum* originaria del sur de Chile es de alta variabilidad genética.

El objetivo general de este trabajo es evaluar la diversidad genética de papas nativas (*Solanum tuberosum* ssp. *tuberosum* L.) silvestres y cultivadas del sur de Chile, mediante el uso de marcadores microsatélites.

Entre los objetivos específicos propuestos se encuentran:

- Cuantificar la diversidad genética de las papas nativas del sur de Chile.
- Determinar si existe relación entre el lugar de origen de las accesiones y los grupos filogenéticos.
- Detectar la presencia de posibles duplicados en la colección estudiada.

2. REVISION BIBLIOGRAFICA

2.1. Antecedentes de la papa cultivada

En el mundo existen mas de 2000 especies dentro del género *Solanum* , el que esta dividido en varios Subgéneros, encontrándose la papa dentro del Subgénero *Potatoe* (G.Don) D'Arcy. El Subgénero *Potatoe* posteriormente ha sido dividido en secciones, donde la Sección *Petota* incluye las especies formadoras de tubérculos, y que a la vez está dividida en 19 Series (HAWKES, 1990). Dentro de la Serie *Tuberosa* se encuentra la especie tetraploide cultivada *Solanum tuberosum* ssp. *tuberosum* y *S. tuberosum* ssp. *andigena*, otras especies diploides cultivadas emparentadas, y un gran número de especies silvestres no cultivadas posiblemente emparentadas (GRUN, 1990).

La papa cultivada a nivel mundial es denominada *Solanum tuberosum* ssp. *tuberosum* Hawkes. Sin embargo, existen siete especies de papas cultivadas, incluyendo a *S. tuberosum* y que corresponden a las especies *S. ajanhuiri*, *S. chaucha* , *S. curtilobum*, *S. juzepczukii*, *S. phureja* y *S. stenotomum* (HUAMAN y SPOONER, 2002).

Según HAWKES (1972a), las especies de papas se distribuyen desde el estado de Colorado y Utah en Estados Unidos hasta la isla de Chiloé en el sur de Chile, encontrándose desde el nivel del mar hasta por sobre los 4500 m. en Los Andes sudamericanos.

Los niveles de ploidía han sido de gran importancia en la clasificación e identificación de papas cultivadas. Los primeros conteos de cromosomas en papas cultivadas y el descubrimiento de distintos niveles de ploidía (diploides, triploides, tetraploides y pentaploides) son mencionados por BUKASOV (1939). El autor utilizó esta información para especular sobre el origen de algunas especies de papas, que al parecer serían híbridos entre otras especies de papas.

Dentro de la especie *S. tuberosum* L. ($2n=48$) se incluyen todos los cultivares tetraploides, distinguiendo al grupo de los Andes como subespecie *andigena* y a las nativas de la Isla de Chiloé, archipiélago de los Chonos y áreas adyacentes en el sur de Chile continental, como subespecie *tuberosum* (HAWKES, 1972b; HAWKES, 1990). Las poblaciones chilenas de papa y los cultivares modernos son clasificados en forma colectiva con el nombre de *S. tuberosum* ssp. *tuberosum* debido a sus similitudes morfológicas y de adaptación a floración y tuberización bajo condiciones de día largo (Hawkes, 1990, citado por HUAMAN y SPOONER, 2002).

2.1.2. Origen y evolución de *Solanum tuberosum* L. Según Bukasov (1966; 1970) el centro de diversidad genética de las papas cultivadas está en Sudamérica, y asumiblemente el centro de origen de las primeras papas cultivadas es alrededor del Lago Titicaca. Además, como centro secundario de variabilidad de papas cultivadas se considera a la zona sur de Sudamérica, particularmente Chile (GRUN, 1990).

Hawkes (1979, 1988), citado por ESTRADA (s/f), menciona que las primeras papas domesticadas pertenecieron a la especie *Solanum stenotomum*, la cual derivó de *S. leptophyes*. A su vez, *S. stenotomum* probablemente se cruzó con *S. sparsipilum*, una especie silvestre diploide para producir *S. andigena*, precursora de la papa tetraploide actual (ssp. *andigena* y ssp. *tuberosum*) (Figura 1).

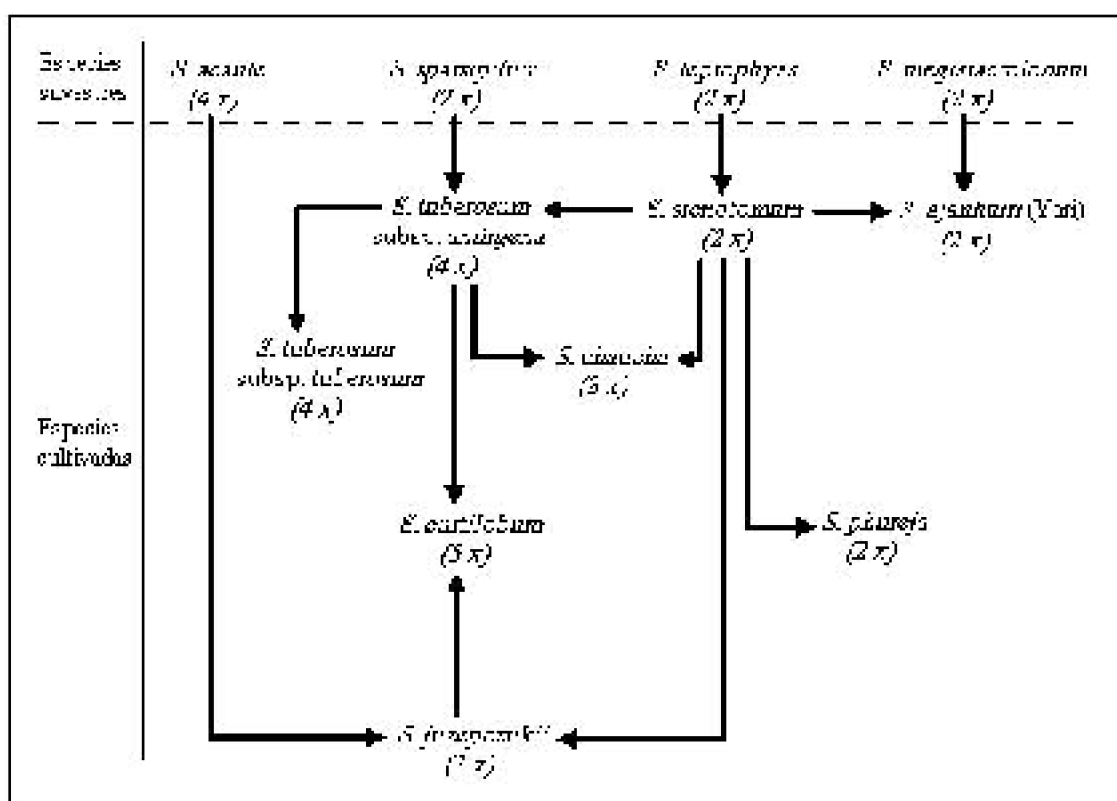


FIGURA 1. Relaciones evolutivas de las papas cultivadas y sus niveles de ploidía.

FUENTE: HAWKES (1994).

Datos históricos indican que la papa fue introducida a Europa en dos ocasiones, una a España en 1570, y que correspondería a papas del tipo Andigena procedentes de la zona norte de los Andes. Una segunda habría ocurrido cerca de 1590 a Gran Bretaña, la cual se cree que fue independiente de las primeras introducciones españolas (SIMMONDS, 1979; HAWKES, 1994; BROWN, 1990).

Sin embargo, la teoría rusa de Bukasov del origen de la papa en Europa, indica que fue en Chiloé donde se originó la especie *S. tuberosum* L., y que ésta se habría originado a partir de dos especies chilenas tetraploides: *S. leptostigma* y *S. molinae*. De esta forma la especie chilena habría sido llevada a Europa en alguna de sus variedades, participando fuertemente en la formación de la papa antigua cultivada en el viejo mundo (CONTRERAS, 1987).

Al respecto SALAMAN (1949), señala que Drake recibió papas en el año 1578 de los naturales de Isla Mocha (Concepción). FUESS (1938), menciona que el antiguo grupo de cultivares inglés-norteamericano tendría su origen en material chileno llevado desde Chile a Inglaterra alrededor de 1586 vía Cartagena. Por otro lado datos apuntados por SIEBENEICK (1948), hacen referencia a que la variedad Paterson Victoria, una antigua variedad inglesa, habría sido introducida en el siglo XVII desde Chile a Irlanda, y de allí algo después a Inglaterra.

Según DODDS (1966), la tesis de la introducción de la papa de Chiloé no tiene fundamentos, ya que los datos históricos son contrarios a dicha tesis, y además que la

papa andina tiene la potencialidad genética para desarrollar rápidamente tolerancia a días largos. Indicando que ya en Europa una de las primeras respuestas adaptativas de la planta fue la tolerancia a días largos.

No obstante, una variedad chilena, fue muy importante en la fase tardía del mejoramiento de la papa. SIMMONDS (1979), menciona que la variedad “Rough Purple Chili” (Púrpura casposa de Chile), fue introducida alrededor de 1850 a Estados Unidos debido a la necesidad que se tenía de crear variedades resistentes al tizón tardío, siendo utilizada ampliamente en programas de mejoramiento de éste cultivo. En la actualidad esta variedad es considerada como uno de los “ancestros universales” de la papa cultivada en el mundo (BROWN, 1990). Como descendencia de este material, van Rathlef (1933), menciona mas de 600 variedades europeas y americanas emparentadas en línea directa con la Púrpura casposa de Chile (CONTRERAS, 1987). Entre otras variedades chilenas importantes que contribuyeron a este proceso pueden mencionarse a Daber, Chilote Indianer y Villaroela entre otras (HAWKES, 1956; GLENDINNING, 1975; PLAISTED y HOOPES, 1989).

Según ESTRADA (s/f), producto de las sucesivas introducciones de material de especies silvestres y cultivadas como *S. demissum*, *S. phureja*, y *S. chacoense* por presentar resistencia a enfermedades y en algunos casos sus híbridos tener mayor rendimientos, se produjo una nueva diversidad genética en Europa a partir de la segunda mitad del siglo XX.

2.1.3. Evolución de *S. tuberosum* subespecie *tuberosum*. Similitudes morfológicas entre *S. tuberosum* ssp. *andigena* y ssp. *tuberosum* sugieren que esta última subespecie se originó de la selección de la ssp. *andigena* en el sur de Chile y Argentina para dar origen a la ssp. *tuberosum*, y en una segunda ocasión en el norte de Europa para producir la papa cultivada y distribuida en todo el mundo (GRUN, 1990; HAWKES, 1990).

Algunos autores sugieren que la evolución de *S. tuberosum* ssp. *tuberosum* surgió probablemente del cruce entre ssp. *andigena* como progenitor macho y otra especie silvestre no identificada, la cual contribuyó con los óvulos y por lo tanto con factores citoplasmáticos de esterilidad (GRUN, 1990, ESTRADA, s/f).

Rickeman y Desborough (1978), citados por HAWKES (1994), compararon las especies cultivadas *S. tuberosum* ssp. *tuberosum* con la ssp. *andigena*, *S. stenotomum* y *S. phureja* mediante electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida, llegando a la conclusión de que la ssp. *andigena* fue derivada de la cruce de *S. stenotomum* y una especie diploide, a la vez que la ssp. *tuberosum* derivó de la ssp. *andigena*.

Esto concuerda con lo citado por otros autores con respecto a la hipótesis del origen de la ssp. *tuberosum*, y que al parecer fue producto del cruzamiento de la ssp. *andigena* con una especie silvestre no identificada que le aportó factores de esterilidad; Siendo las especies que se barajan *S. maglia* y *S. chacoense*, pero esto aún no ha sido determinado (GRUN, 1990). Los antecedentes que vincularían a *S. maglia* como posible progenitor de la ssp. *tuberosum* fueron aportados por UGENT *et al.* (1987), en base a especímenes de *S. maglia* encontrados en el sitio arqueológico de Monte Verde, que datan de hace 13.000 años. El estado de conservación en que se encontraron indicarían su aparente

consumo por parte de pueblos aborígenes, representando el registro más antiguo de papas en Chile. Estos autores en base a similitudes de los granos de almidón entre *S. maglia* y *S. tuberosum* ssp. *tuberosum*, proponen a ésta especie silvestre como el posible progenitor de la ssp. *tuberosum*.

2.2. Germoplasma Chileno de Papas y estudios de clasificación

En Chile se han podido determinar las siguientes series dentro de la sección *Petota*: serie *Cuneolata* Hawks, con la especie *S. infundibuliforme* Phil.; serie *Etuberosa* Juz., con *S. etuberosum* Lindl., *S. fernandezianum* Phil. y *S. palustre* Poepp. Ex. Schltd; serie *Juglandifolia* (Rydb.) Hawkes, con *S. lycopersicoides* Dun. y *S. sitiens* Johnston; serie *Maglia* Bitt. con *S. maglia* Schltd., y serie *Tuberosa* con *S. tuberosum* ssp. *andigena* y *S. tuberosum* ssp. *tuberosum* (CONTRERAS, 2000). Según SPOONER *et al.* (1991), las especies *S. etuberosum*, *S. fernandezianum*, *S. palustre*, *S. sitiens*, y *S. tuberosum* ssp. *tuberosum* son consideradas como endémicas de Chile.

Debido a esta riqueza presente en el país, en 1956, investigadores de la Universidad Austral de Chile crean una colección de germoplasma de estas especies (CONTRERAS, 1978). Posterior a esto se han realizado múltiples expediciones recolectoras de material silvestre y cultivado, principalmente a la Isla de Chiloé (CONTRERAS y RAMIREZ, 1978; CONTRERAS *et al.*, 1979; CONTRERAS *et al.*, 1980; CONTRERAS y MONTALDO, 1985; CONTRERAS *et al.*, 1986; CONTRERAS y THOMANN, 1986, y CONTRERAS *et al.*, 1993).

Evaluaciones de este material, indicarían la importancia que presenta el material nativo chileno en mejoramiento nacional e internacional de la papa, debido a que éste presenta características altamente deseables como resistencia a enfermedades bacterianas, fungosas y virales, buena calidad nutritiva, resistencia a factores ambientales adversos como estrés hídrico, rendimiento, etc. (CONTRERAS, 1987).

Los primeros estudios realizados en el material chileno se basaron principalmente en un ordenamiento taxonómico del material. Carlos Reiche en 1910 propone una nueva agrupación de las papas chilenas, agrupándolas casi todas bajo el nombre de *S. tuberosum*. Mediante amplias descripciones de las papas de Chile a base de material herborizado, Bitter en 1911 y 1912, trata de poner orden con respecto a la amplia sinonimia existente. Otro estudio encargado por el Ministerio de Agricultura a Alvaro Montaldo en 1941, consistió en la recolección de papas silvestres y cultivadas desde las Provincias de Valdivia a Chiloé, luego de lo cual vendría la isla de Juan Fernández, además de la zona comprendida entre Coquimbo y Aysén (MONTALDO y SANZ, 1962).

CONTRERAS (1969), a través de análisis anatomorfológicos pudo determinar una clasificación y una identificación de sinonimias en una colección de papas chilenas. Sin embargo, este autor hace referencia a la influencia de determinados factores, en especial al medio ambiente en la variación de características botánicas de la papa, modificando el

desarrollo normal de la planta. Estas características pueden no ser suficientes para determinar un cultivar.

Utilizando electroforesis de proteínas y esterasas investigadores de la Universidad Austral de Chile (MACIAS, 1986; MACIAS *et al.*, 1989; CONTRERAS y MANCILLA, 1989; JOPIA, 1997) han podido identificar clones de variedades de *S. tuberosum* ssp. *tuberosum*, logrando detectar sinonimia dentro de la colección dado por los distintos patrones electroforéticos encontrados.

Esta técnica presenta una importante ayuda porque permite hacer una rápida y certera identificación entre clones de papa, lo que es importante en el mantenimiento de bancos de genes (CONTRERAS y MANCILLA, 1989). Siendo de gran utilidad cuando se hace necesario evaluar un gran número de individuos, a un precio comparativamente bajo, permitiendo hacer una primera identificación, reduciendo la cantidad de individuos a analizar mediante marcadores moleculares de mayor poder resolutivo (CAMPOS y SALVO, 1995).

Con respecto a la diversidad genética del material chileno, GLENDINNING (1975) y GLENDINNING (1978) opinan que es un material altamente imbricado, y por lo tanto de una base genética muy estrecha, lo que la hace poco útil para el mejoramiento.

El mayor conocimiento de la constitución genética de las especies cultivadas y silvestres puede permitir un uso más eficiente del germoplasma en el mejoramiento de plantas. Es así como los marcadores moleculares representan una poderosa herramienta para determinar la diversidad genética de una especie (dentro de poblaciones y entre ellas), distribución geográfica de esta diversidad y el nivel de introgresión o movimientos de genes desde otras especies (PAREDES *et al.*, 1999).

2.3. Marcadores moleculares

CAMPOS (1995), define a los marcadores moleculares como toda variabilidad de naturaleza bioquímica / molecular susceptible de ser de algún modo asociada con la variabilidad de algún parámetro morfológico / agronómico.

2.3.1. Marcadores bioquímicos. Los marcadores bioquímicos más conocidos y utilizados en plantas son las isoenzimas y las proteínas de almacenaje de las semillas (VAZQUEZ *et al.*, 2000).

Por su naturaleza fenotípica las isoenzimas presentan un bajo nivel de polimorfismo y poseen una herencia mendeliana codominante (GRATTAPAGLIA y FERREIRA, 1996).

Si bien es cierto las proteínas de reserva son abundantes en las semillas, y el grado de polimorfismo detectado es más elevado que el de las isoenzimas, presentan la desventaja que el número de locus que detectan es reducido resultando en una discriminación genotípica no muy elevada (CAMPOS, 1995).

Recientemente HUAMAN *et al.* (2000), utilizando isoenzimas fueron capaces de determinar la diversidad genética en cultivares de *S. tuberosum* ssp. *andigena* a partir de

una colección base o “core colection”. El autor señala que la información entregada por las isoenzimas con respecto a la cantidad de diversidad genética es mas confiable que la entregada por descriptores morfológicos.

2.3.2. Marcadores genotípicos. En los últimos años se ha desarrollado una serie de métodos basados en el examen directo de las moléculas del ácido desoxirribonucleico (ADN), destinados a detectar polimorfismo a nivel genético (PAREDES et al., 1999). Entre las técnicas de marcadores genotípicos que se basan en la variabilidad de las secuencias genéticas (ADN), destacan los fragmentos de restricción polimórficos (RFLPs), amplificación al azar de ADN (RAPDs), fragmentos polimórficos de ADN amplificados (AFLPs) y marcadores microsatélites (SSRs) (CAMPOS, 1995).

GRATTAPAGLIA y FERREIRA (1996) señalan que en los RFLPs el polimorfismo esta dado por el tamaño del fragmento de ADN que se genera al ser digerido por una enzima de restricción, donde el ADN es separado mediante electroforesis, luego de lo cual es hibridado con sondas marcadas con isótopos radiactivos o no radiactivos, revelándose en una fuente de rayos X.

Los RFLPs han sido uno de los marcadores genéticos mas utilizados en el mejoramiento genético. En papa, distintas poblaciones diploides han sido extensamente mapeadas (Bonierbale *et al.*, 1998; Tanksley *et al.*, 1992; Gebhardt *et al.*, 1989 citados por MILBOURNE *et al.*, 1998).

La técnica de la Reacción de la Polimerasa en Cadena (PCR) a contribuido a generar varios marcadores genéticos como RAPDs, AFLPs y microsatélites (CAMPOS, 1995). Esta técnica fue desarrollada por Mullis y Faloona (1987), como un método para amplificar secuencias específicas de ADN. Un ciclo PCR (Figura 2) consiste de 3 etapas: en la etapa de denaturación mediante el aumento de la temperatura a cerca de 95 °C se separan las 2 hebras de la molécula de ADN. En la segunda etapa llamada de acoplamiento (“annealing”) la temperatura es reducida a 35-60 °C para permitir que los partidores hibridizen con las secuencias complementarias del ADN , y en la ultima etapa el partidador sirve como molde y actúa como complejo de iniciación para la ADN polimerasa. En esta etapa ocurre la elongación de la nueva hebra de ADN, gracias al aumento de la temperatura a 72 °C, temperatura óptima de trabajo de la ADN polimerasa de *Thermus aquaticus* (*Taq*). Esta enzima cataliza la unión de los nucleótidos complementarios a la hebra molde (STOLOVITZKI y CECCHI, 1996).

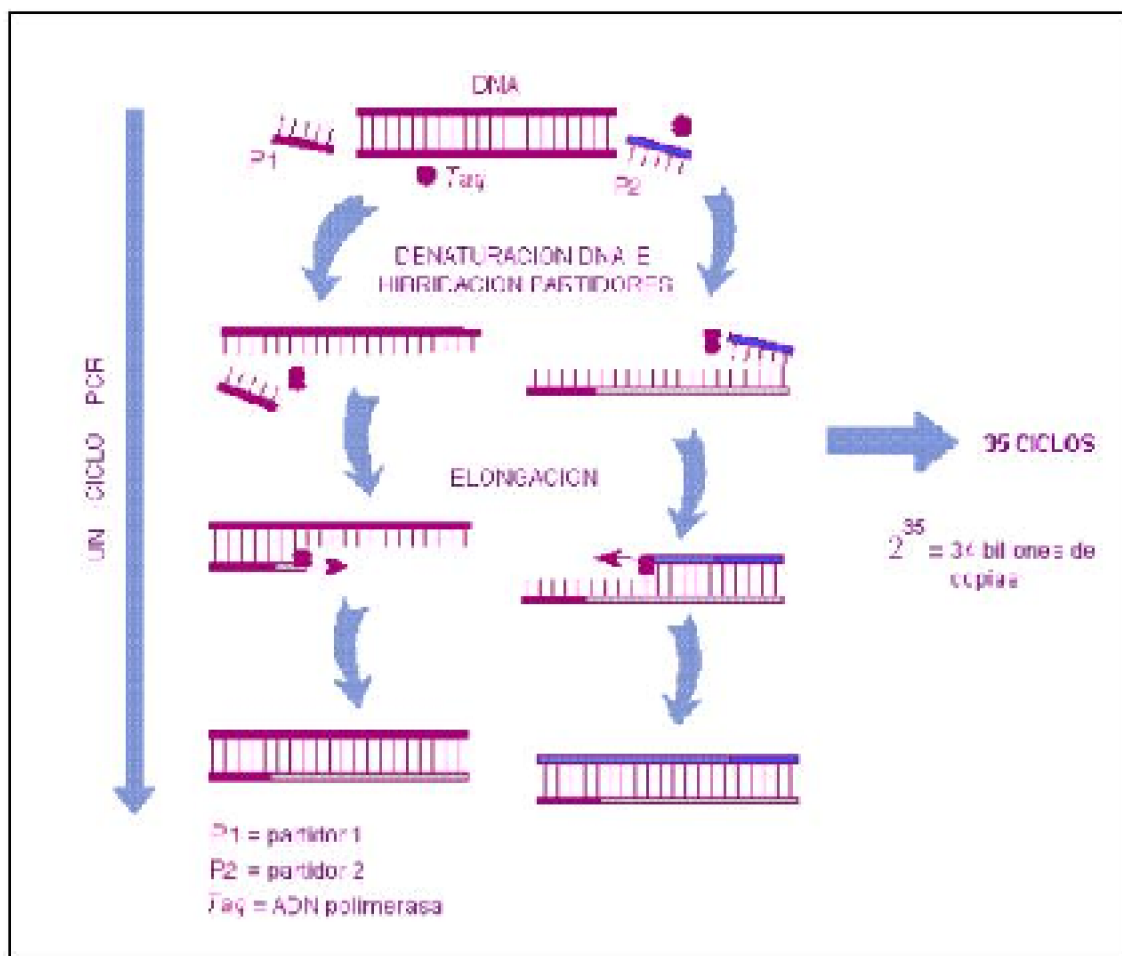


FIGURA 2. Esquema de la Reacción de la Polimerasa en Cadena (PCR).

Los RAPDs se obtienen mediante la amplificación por PCR del ADN genómico usando un solo partidor. La amplificación se producirá si los partidores están situados a una distancia corta, entre 200 y 2000 pares de bases (GARCIA-MAS *et al.*, 2000). De acuerdo a CAMPOS (1995), la desventaja de los RAPDs es la poca reproducibilidad entre distintos laboratorios. Por otro lado la técnica conocida como AFLPs combina fundamentos de los RFLPs y la PCR. La eficiencia en detectar polimorfismo puede ser varias veces mayor que la obtenida con los RAPDs y RFLPs (BECERRA y PAREDES, 2000). Entre sus desventajas esta el hecho de poseer muchas etapas, necesitar un gran equipamiento y ADN de alta calidad, lo que aumenta los costos (GRATTAPAGLIA y FERREIRA, 1996).

En el Centro Internacional de la Papa (CIP) colecciones de papa ya han sido caracterizadas en los últimos años con marcadores del ADN, incluyendo RAPDs, AFLPs, y microsatélites (GHISLAIN *et al.*, 2000).

2.3.3. Marcadores microsatélites (SSR s). Las secuencias simples repetitivas (SSRs) o microsatélites, son secuencias cortas de ADN repetidas en tandem y generalmente menores a 100 pares de bases (pb.) (TAUTZ y RENZ, 1984). Estas secuencias, por lo general, son repeticiones de dinucleótidos (ej.: CA_n; CA_n-CCA-CA_n), y en el genoma de los vegetales el dinucleótido más abundante es el AT_n donde n representa el número de repeticiones del motivo (Figura 3) (Smulders *et al.*, 1997, citado por GARCIA-MAS *et al.*, 2000).

Se piensa que el mecanismo por el cual mutan los microsatélites es debido al deslizamiento (disociación y asociación equivocada) de la cadena de ADN que está siendo replicada, produciéndose la inserción o delección de unidades repetitivas, por lo tanto alterando el tamaño del alelo (KRUGLYAK *et al.*, 1998).

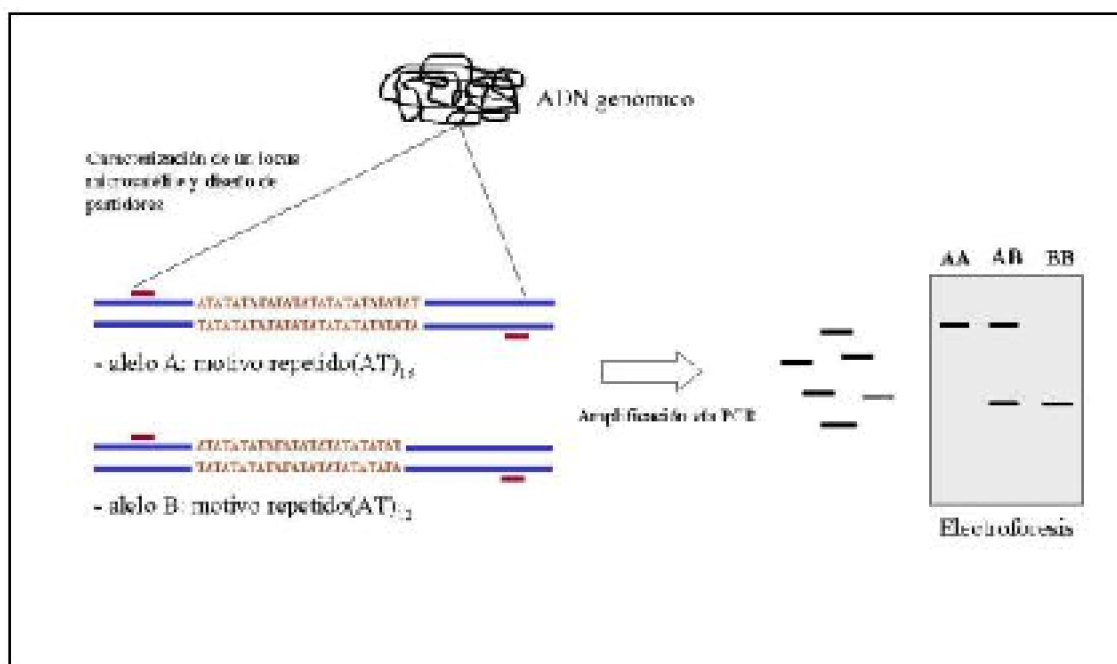


FIGURA 3. Diagrama del desarrollo de marcadores del tipo microsatélites.

FUENTE: Adaptado de GARCIA-MAS *et al.* (2000).

Mediante el diseño de partidores específicos para las secuencias más conservadas que flanquean el motivo repetido, se puede amplificar vía PCR la región repetitiva (GARCIA-MAS *et al.*, 2000). El polimorfismo de un locus microsatélite puede ser comprobado sobre la base de una corrida electroforética de productos PCR y la visualización de todos los alelos posibles para el locus (Rafalski *et al.*, 1996 citado por MILBOURNE *et al.*, 1998).

2.3.3.1. Ventajas de los microsatélites en la caracterización genética. Entre las ventajas del uso de secuencias microsatélites para detectar polimorfismo, POWELL *et al.* (1996), menciona las siguientes: son relativamente abundantes y con una cobertura uniforme del genoma; hipervariables, es decir, entregan un alto contenido de información, lo cual es una característica del número y frecuencia de alelos detectados; son codominantes y altamente reproducibles; basadas en la PCR, y cada locus definido por una secuencia de partidores.

Los marcadores microsatélites, al ser de naturaleza codominantes, contribuyen al conocimiento de la diversidad alélica de una colección (ZHANG *et al.*, 2000). En cambio los marcadores dominantes como RAPDS y AFLPs son limitados en cuanto a la información que entregan con respecto a identidad y distinción (GHISLAIN *et al.*, 2000).

En un estudio comparativo realizado en variedades de papa tetraploide, utilizando las técnicas de RAPDS, AFLPS, SSRS, eISSRS se determinó que los cuatro marcadores permiten la identificación de papas tetraploides. Sin embargo, difieren en el número de perfiles generados por par de partidores, por cultivar o Índice Genotípico (IG), siendo los más altos para SSRS y AFLPS. Por otro lado la reproducibilidad mostrada por las secuencias microsatélites fue de un 100% (MC GREGOR *et al.*, 2000).

Según GHISLAIN *et al.* (2000), la ventaja de los marcadores codominantes como microsatélites, es la posibilidad de mostrar todos los alelos de un locus simple en individuos heterocigotos, de modo que entregan mayor información para establecer relaciones genéticas entre individuos.

Gracias al trabajo realizado por MILBOURNE *et al.* (1998), en el cual desarrollaron marcadores microsatélites polimórficos específicos para *S. tuberosum*, se hace mucho más fácil el estudio de la especie con estas secuencias. Otra ventaja es que la ubicación dentro del genoma es conocida. GHISLAIN *et al.* (2000); GHISLAIN *et al.*, (2003) utilizaron parte de estos microsatélites para caracterizar un grupo de siete especies de papas, incluida *S. tuberosum* ssp. *tuberosum*, logrando seleccionar un grupo de 23 microsatélites en base a la calidad de ADN amplificado, su ubicación en el genoma, y nivel de polimorfismo detectado. Siendo esta información de gran utilidad para ser utilizada en el manejo de bancos de germoplasma de papa.

2.3.3.2. Aplicaciones de las secuencias microsatélites en el mejoramiento genético de plantas. La habilidad de distinguir entre individuos estrechamente emparentados es particularmente importante para muchas especies cultivadas, las cuales tienden a tener una estrecha base genética (POWELL *et al.*, 1996). Es por esta razón que los microsatélites han sido usados en diversas especies anuales como: soya, arroz, maíz, cebada, trigo y raps para medir diversidad genética (BECERRA y PAREDES, 2000).

Según POWELL *et al.* (1996), uno de los primeros usos de los SSR ha sido la identificación de variedades. HAWCHUK *et al.* (1996) utilizaron exitosamente estos marcadores para la identificación de cultivares comerciales de papa, mostrando esta técnica una alta reproducibilidad en los alelos encontrados.

También con el desarrollo de los microsatélites se han creado grupos de ligamiento para alguna especie, permitiendo usar estas secuencias como marcadores o indicadores de características importantes en los programas de mejoramiento (ZAVALA, 2002).

Uno de los usos mas recurrentes de estos marcadores según BRYAN *et al.* (s/f), es el análisis de poblaciones de papa. Sin embargo, menciona que una de las aplicaciones mas importantes que tendrían en un futuro, sería usar estos poderosos marcadores para la caracterización genética de germoplasma de papas.

Estudios realizados por RAKER y SPOONER (2002), en *Solanum tuberosum* ssp.

tuberosum y ssp. *andigena* utilizando regiones microsatélites permitieron distinguir a ambas subespecies, y a éstas de otras especies de papas cultivadas y silvestres, de tal forma que estos resultados apoyarían las diferencias genéticas entre ambas poblaciones de *S. Tuberosum*.

Estos mismos autores, hacen referencia a que el alto nivel de polimorfismo y heterocigosidad de estas secuencias microsatélites en *S. tuberosum*, hace de estos marcadores moleculares importantes herramientas para detectar diferencias genéticas entre individuos muy relacionados.

3. MATERIAL Y METODO

3.1. Material

Los materiales utilizados en la parte experimental de la presente tesis, se describen a continuación:

3.1.1. Material vegetal. Se analizaron 249 accesiones de papas (*Solanum tuberosum* ssp *tuberosum*) nativas del sur de Chile, dentro de las que se incluyen accesiones nativas de la Isla de Chiloé (formada básicamente por variedades típicas chilotas), material silvestre colectado en el Archipiélago de los Chonos y material colectado en otros lugares del sur de Chile. Además, fue utilizado como material de referencia 24 cultivares antiguos europeos. Las accesiones se agruparon según origen geográfico e información disponibles. Se formaron los siguientes grupos: “Chiloé” (variedades típicamente chilotas)(Anexo 1); “Chonos” (Anexo 3); “Colección” (sin información respecto a su origen geográfico o accesiones distintas de Chiloé y Chonos)(Anexo 2) y “Europeas” (Anexo 4). Todo el material en estudio forma parte del Banco de Germoplasma Chileno de Papas de la Universidad Austral de Chile.

3.1.2. Material de laboratorio. Los materiales y equipos de laboratorio usados para llevar a cabo la investigación son los siguientes:

- Equipos: Refrigerador a 4 °C (BOSCH) para almacenar reactivos que necesiten baja

temperatura y freezer a -20°C para conservar las muestras de ADN, los productos amplificados, ingredientes de la PCR y otros como marcadores de peso. Microcentrífuga para tubos Eppendorf (DenverInstrument) usada en la extracción de ADN. Baño María para la incubación de muestras. Taladro (BOSCH). Termociclador marca PTC-100™ (MJ RESEARCH) para 96 muestras. Cámara de electroforesis horizontal para geles de agarosa. Horno microondas para preparar agarosa. Transiluminador (VILBERT LOURMAT). Cámara de electroforesis vertical para geles de poliacrilamida (SCIE-PLAS). Fuente de poder para electroforesis 3000 V , 300 mA (CONSORT). Micropipetores de 2 μL , 10 μL , 20 μL , 100 μL , 200 μL y 1000 μL (RAININ), además de un micropipetor multicanal de 2-20 μL (RAININ). Balanza de precisión (Ohaus). Autoclave de control manual para esterilizar material desechable y agua destilada-desionizada. Equipo desionizador de agua (Barnstead). Bomba de vacío para el filtrado de la solución stock de poliacrilamida (GAST). Agitador para disolver soluciones, y vortex (LAB-LINE INSTRUMENTS) para homogeneizar productos que estén en solución.

- Material desechable: Tubos Eppendorf de 1,5 mL y de 0,2 mL. Puntas plásticas para micropipetores. Guantes de látex.

- Material reutilizable: Material de vidrio (matraces, probetas, pipetas, vasos precipitados, frascos SCHOTT de 100 mL, 500 mL y 1000 mL). Vidrios para preparar geles de poliacrilamida (41 x 33 cm), separadores de plástico para los vidrios, peine plástico para formación de pocillos, doble clips. Espátulas de metal, varillas agitadoras magnéticas, recipientes plásticos como bandejas con y sin tapa

3.1.3. Reactivos. Los reactivos utilizados en cada una de las metodologías se mencionan a continuación, así como las características de los compuestos y la empresa fabricante, o el proveedor.

- Extracción de ADN: Tris (TCL), sal sódica de etilendiaminotetra acetato EDTA (GIBCO BRL), cloruro de sodio 1,4 M (Scharlau), bromuro de centriltrimetilamina CTAB 2% (MERCK), 2-Mercaptoetanol (BIO-RAD), bisulfito de sodio (Mallinckrodt), hidróxido de sodio (Scharlau), cloroformo (TCL), alcohol isoamilico (MERCK), etanol 95% (TCL).

- Reacción PCR: Taq DNA polimerasa 5 U/ μL , buffer PCR 10X, cloruro de magnesio 50 mM y desoxiribonucleótidos trifosfato 100 mM c/u (Invitrogen).

- Electroforesis en geles de agarosa: Tris base, ácido bórico (Mallinckrodt), EDTA 0,5 M pH 8,0 (GIBCO BRL), agarosa (TCL), azul de bromofenol (Aldrich Chem. Co.), glicerol (Fluka), λ DNA/Hind III (Fermentas), bromuro de etidio 10 mg/mL (GIBCO BRL).

- Electroforesis en geles de poliacrilamida: Tris, EDTA, ácido bórico, urea (TCL), acrilamida (TCL), bis-acrilamida (TCL), TEMED (TCL), persulfato de amonio (TCL), Silane A 174 (MERCK), SIGMACOTE® (SIGMA), xilen cianol (SIGMA), azul de bromofenol, GeneRuler™ 50bp DNA Ladder (Fermentas).

- Tinción de geles con plata: ácido acético glacial y nitrato de plata de EQUILAB; carbonato de sodio, formaldehído 37%, y tiosulfato de sodio pentahidratado, marca Scharlau.

3.2. Método

En este capítulo se hace referencia a la metodología empleada en cada una de las etapas de la parte práctica de esta tesis.

3.2.1. Extracción de ADN. Para la realización de esta tesis se contó con ADN de cada planta de papa, el que fue extraído en el Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Agrarias a partir de plantas cultivadas en invernadero. Este trabajo fue realizado en su mayor parte por la Lic. en Agronomía Mónica Mathias el año 2002.

El método utilizado fue el propuesto por DOYLE y DOYLE (1990), el que es apropiado para un gran número de especies vegetales. Consistió en macerar tejido vegetal fresco dentro de tubos Eppendorf con 100 μ L de tampón de extracción (CTAB 2%; mercaptoetanol 0,4%; NaOH 8M; NaHSO₃ 0,38%) con la ayuda de un taladro. Luego a cada tubo se le agregaron 400 μ L de tampón de extracción y fueron puestos a incubar a baño maría a 65°C por 30 minutos, mezclando de vez en cuando por inversión. Terminado el periodo de incubación a cada muestra se le agrega un volumen de 500 μ L de cloroformo: alcohol isoamílico 24:1 y se mezcla 5 minutos por inversión, para después ser centrifugados a 14000 r.p.m. y recuperar el sobrenadante. El lavado de las muestras con este solvente orgánico tiene como finalidad separar el ADN de otros compuestos como polisacáridos y proteínas. La precipitación del ADN se logra adicionando 1000 μ L de etanol 96° frío y mezclando suavemente por inversión hasta que precipite el ADN. Se centrifuga nuevamente por 5 minutos a 14000 r.p.m. y se elimina el sobrenadante, quedando un pelet en el fondo de los tubos. A continuación el pelet es lavado con etanol 70° agitando por 5 minutos para después ser centrifugados 5 min. a la misma velocidad; el sobrenadante es eliminado y el pelet se deja secar por unos 15 minutos a 35° en una estufa. Finalmente se agrega un volumen de 100 μ L de agua desionizada estéril a cada tubo y se deja resuspender el ADN por una hora a 35°C. Posteriormente las muestras de ADN fueron almacenadas en un freezer a -20 °C.

El ADN obtenido, se evaluó en función de su calidad y concentración mediante su visualización en geles de agarosa al 1% peso/volumen (p/v). Los geles fueron preparados agregando 0,4 gramos de agarosa en un volumen de 40 mL de buffer TBE 0,5X (44,5 mM Tris-Acido Bórico (pH 8); 1 mM EDTA) y fundido en microondas y luego vertido en una placa de electroforesis que contiene un peine con el cual se forman los pocillos. Se tomó un volumen de 7 μ L del ADN extraído y mezclado con 3 μ L de buffer de carga (60% glicerol; 0,12% azul de bromofenol; 0,12% xilen cianol; buffer TBE 1X), el que se depositó en los pocillos formados en el gel, usando además en el primer pocillo un marcador de peso conocido (λ DNA/Hind III de Fermentas), el cual ayudó a estimar la longitud de los fragmentos observados de cada muestra. La electroforesis se llevó a cabo en una cámara horizontal conteniendo buffer TBE 0,5X .

La corrida electroforética se realizó suministrando un voltaje de 50 volt, luego de lo cual, el gel fue teñido en bromuro de etidio (50 ng/ μ L) por 30 minutos y expuesto a una fuente de luz ultravioleta (transiluminador VILBERT LOURMAT), donde se visualizan las

bandas de ADN.

3.2.2. Selección de los marcadores microsatélites. Las secuencias microsatélites que fueron utilizadas en esta tesis han sido descritas en la literatura para la especie *Solanum tuberosum*, y los partidores para su amplificación descritos por MILBOURNE *et al.* (1998). El trabajo de selección de estos partidores se llevó a cabo en el Laboratorio de Biología Molecular perteneciente al Instituto de Producción y Sanidad Vegetal, y algunos ya habían sido usados para analizar parte del material en estudio. La síntesis de los partidores fue llevada a cabo por MWG-Biotech (USA). Las características de los partidores seleccionados se describen en el Cuadro 1.

Para la elección de estos microsatélites se tomó en cuenta el hecho de que ya han sido utilizados anteriormente en otras especies de papas cultivadas (*Solanum spp.*) (GHISLAIN *et al.*, 2000; GHISLAIN *et al.*, 2003), son estables en la amplificación, están ubicados en distintos cromosomas, y detectan un alto polimorfismo.

CUADRO 1. Característica de los marcadores seleccionados.

Código la	B	Código	SCRI	Secuencia	Secuencia	Tamaño	Tamaño
1	2	3	4	5	6	7	8
S029	STP	Ac58	V	TTGATGAAAGGAATGCA	(CA) ₁₃ TGACGTA	174	236
S039	STM	1058	II	ACAATTTAATTCAAGAA	(GT) ₅ AGG CCA	175	213
S042	STM	003	XI	AATTTAACTTAGAAGAT	(AG) ₅ (CA) ₆ ATT	155	175
					AA (AC) ₇		
					(AT) ₄		
S081	STM	1104	VIII	TGATTCTCTTGCCTACT	(TA) ₅ TCG CAA	180	168
S101	STM	1108	X	TCCAGCTGATTGGTTAG	(ATT) ₁₃ ATGCG	160	172
S104	STM	2013	VII	TTCGGAATTACCCTCTG	(CA) ₁₃ AAAAAG	175	146
S106	STM	2021	I	GCGTCAGCGATTTCAG	(CA) ₃ TT (CA) ₁₅ AACT	211	180

¹ SCRI: Scottish Crop Research Institute

² CIP: Centro Internacional de la Papa.

FUENTE: MILBOURNE *et al.* (1998); GHISLAIN *et al.* (2000); GHISLAIN *et al.* (2003).

3.2.3. Condiciones de amplificación de la técnica PCR para microsatélites. La mezcla para la reacción PCR se realizó en un volumen final de 25 µL, la cual estuvo constituida por Buffer PCR 1X (20 mM Tris-HCl (pH 8,4), 50 mM KCl); 1,6 mM MgCl₂; 2 mM de cada uno de los nucleótidos dATP, dGTP, dCTP y dTTP; 10 pmol de cada partidor; 0,5 unidades de taq DNA polimerasa (Invitrogen), y una cantidad aproximada de 10 ng de ADN.

La preparación de la mezcla para la reacción PCR se hizo agregando todos los componentes antes mencionados, a excepción del ADN dentro de un tubo Eppendorf para ser homogeneizados. Se preparó una cantidad suficiente para todas las muestras que se quiere amplificar, preparando siempre un 10% mas del volumen final, para considerar errores de pipeteo. Una vez que la mezcla estuvo lista, se dispensó en tubos para reacción PCR de 0,2 mL, a los cuales se les agregó previamente la cantidad de ADN

recomendada.

La amplificación de las secuencias microsatélites se llevó a cabo en un termociclador modelo PTC-100™ (MJ Research™), usando el programa con los tiempos y temperaturas que se describen en las siguientes etapas: 3 minutos de denaturación a 94 °C, seguido por 40 ciclos de 30 segundos a temperatura de denaturación de 94 °C, 1 minuto a temperatura de hibridación del partidador utilizado (Ta) (Cuadro 1) y 1 minuto de elongación a 72 °C, por último una extensión final de 5 min. A 72 °C.

Concluida la reacción PCR, se procedió a chequear la correcta amplificación de los productos en un gel de agarosa al 1%. A continuación le fue agregado un volumen de 12 µL de buffer de carga para SSR (94% formamida; 0,05% azul de bromofenol; 0,05% xilen cianol; 2 Mm EDTA-Urea).

3.2.4. Electroforesis en geles de poliacrilamida

Esta es una técnica que permite separar el ADN cargado negativamente a través de un campo eléctrico, migrando el ADN sobre una matriz porosa (gel de poliacrilamida) de polo negativo a positivo. De esta forma se logran separar fragmentos de ADN de diferentes tamaños, puesto que fragmentos de menor tamaño migran o avanzan más rápido que los de mayor tamaño.

3.2.4.1. Preparación de los geles. Los geles fueron preparados siguiendo el protocolo propuesto por el Laboratorio de Biología Molecular del Centro Internacional de la Papa; CIP (1999). Los geles de poliacrilamida se obtuvieron haciendo polimerizar 60 ml de una solución stock de poliacrilamida al 6%(19:1acrilamida:bisacrilamida, Tris pH 8) previamente preparada y almacenada en oscuridad a – 4 °C. La polimerización se llevó a cabo al agregar 330 µL de Persulfato de amonio 10% y 33 µL de TEMED ($C_6H_{16}N_2$) que son catalizadores e iniciadores de la reacción respectivamente. Esta solución fue vertida en el espacio que se forma al juntar dos vidrios separados por separadores de plástico entre ambas superficies, lo que forma una especie de “sandwich”, y ambos vidrios son unidos y fijados con la ayuda de dobles clips. Cuando el espacio entre los vidrios fue llenado con la poliacrilamida líquida, se colocó una peineta en forma invertida, es decir, que los dientes no queden en contacto con la poliacrilamida para dejar un espacio que luego de la polimerización del gel, sirven para introducir la peineta con sus dientes hacia el gel y así formar los posillos que servirán para cargar las muestras. Uno de los vidrios fue tratado con una solución adherente (5 µL de Silane A 174; 5 µL de ácido acético glacial y 1,5 mL de etanol 95°) y el otro con repelente SIGMACOTE[®], esto hace posible que una vez concluida la electroforesis y al separar ambos vidrios, el gel quede adherido al vidrio tratado con la solución adherente.

La preparación de los geles fue realizada la tarde del día anterior al día en que serían usados, para darle tiempo a la poliacrilamida a que polimerice. Una vez que el gel estuvo listo, se procedió a retirar los clips y el separador de la parte inferior, lo que permite que el buffer entre en contacto con el gel.

3.2.4.2. Electroforesis. Los productos PCR fueron separados mediante una electroforesis en geles de poliacrilamida en una cámara de secuenciación vertical. Los vidrios fueron fijados cuidadosamente a la cámara, dejando en contacto con buffer TBE 1X (89 mM Tris-Ácido bórico (pH 8); 2 mM EDTA) la parte superior e inferior del gel.

Este tipo de electroforesis en geles de poliacrilamida se realizó en condiciones denaturantes, por lo que antes de cargar las muestras, el gel tuvo que alcanzar una temperatura de aproximadamente 58 °C, temperatura alcanzada luego de suministrar una potencia constante de 90 watts por 45 min. aproximadamente.

Cuando el gel alcanzó la temperatura deseada, se procedió a cargar en los pocillos 5 µL de cada uno de los productos amplificados, y que habían sido previamente denaturados en el termociclador a 95 °C por 5 min. y puestos sobre hielo. En el primer pocillo se colocó el marcador de peso GeneRuler™ 50 bp. (Fermentas), además de algunas muestras estándar que se incluyeron en todos los geles, entre las que se incluyó a la variedad de papa Desirée. Esto permitió en todos los geles reconocer los distintos alelos generados para cada marcador.

Las muestras fueron cargadas lo mas rápido posible para que la temperatura del gel no bajara demasiado. La corrida se realizó a una potencia de 60 watts. El término de la electroforesis fue determinada según el avance de los colorantes constituyentes del buffer de carga que contiene cada muestra, y el tamaño esperado de los fragmentos para cada marcador. En el caso de los geles de poliacrilamida denaturantes al 6%, el xilen cianol migra con fragmentos de ADN de 106 pares de bases (pb.), y el azul de bromofenol, con fragmentos de 26 pb.

Terminada la corrida electroforética, los vidrios fueron separados para proceder a su posterior tinción con nitrato de plata.

3.2.4.3. Tinción con plata de los geles. La tinción de los geles con plata comprendió los siguientes pasos (CIP, 1999):

- Fijación: Se preparó una solución de ácido acético glacial al 10% de 2 litros (usando agua desionizada). El gel fue sumergido en esta solución por 20 minutos agitando de vez en cuando. Posteriormente se procedió a dar dos lavados en agua desionizada, de 2 min cada uno.

- Tinción: Esta solución se preparó en 2 litros de agua desionizada agregando 2 g de AgNO_3 y 3 mL de formaldehído 37%. La tinción se prolongó durante 30 min con agitación de vez en cuando.

- Revelado: La solución de revelado se realizó en un volumen de 1,7 L, con 51 g de NaCO_3 y 2,5 mL de formaldehído 37%. El gel fue mantenido en esta solución hasta que las bandas se hicieron visibles, luego de lo cual se procedió a detener el revelado en la solución de fijación anteriormente usada. Para finalizar se dió un último enjuague y se dejó secar para su posterior evaluación.

3.2.5. Análisis de los datos obtenidos. Los fragmentos (alelos) obtenidos para cada locus microsatélite luego de la corrida electroforética y posterior tinción con plata, fueron evaluados visualmente, comparando cada uno de los fragmentos obtenidos con los fragmentos de referencia que se incluyeron en cada gel, es decir muestras estándar y marcador de peso conocido. De esta forma se determinó el tamaño en pares de bases para cada alelo. Con la información generada se construyó una matriz binaria para cada uno de los microsatélites usados y cada una de las accesiones, asignándose el número “1” a la presencia del alelo y “0” a la ausencia, como lo muestra el ejemplo de la Figura 4.

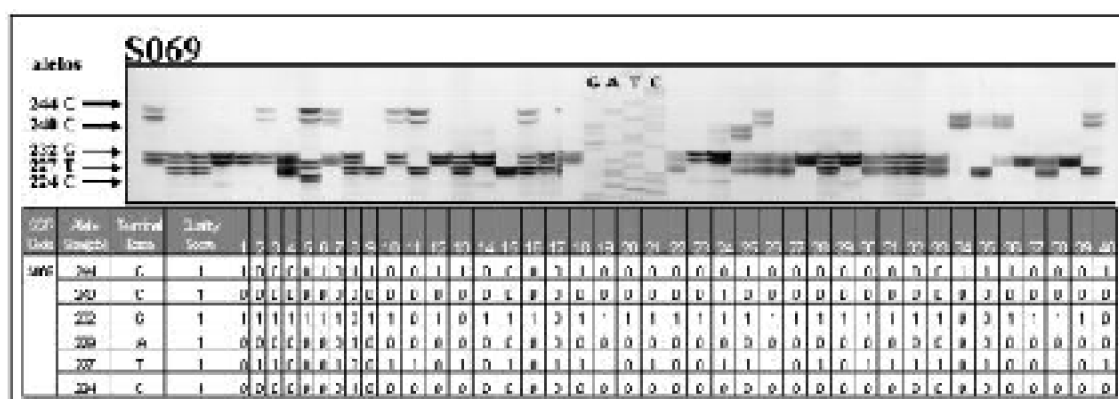


FIGURA 4. Accesiones de *S. tuberosum* analizadas con un marcador microsatélite en gel de poliacrilamida y matriz binaria con la genotipización de las accesiones estudiadas.

Con los datos de la matriz se calculó la distancia genética (NEI, 1978) entre cada uno de los individuos y entre grupos, utilizando el programa POPGENE versión 3.2.

Además, se calcularon varios parámetros de diversidad genética como: número de alelos totales, alelos por locus, heterosigiosidad, y diversidad genética.

El Índice Relativo de Heterocigosidad (*IRH*) fue determinado según la fórmula propuesta por BONIERBALE *et al.* (1993):

$$RHI = \frac{NA - 1}{4 - 1} \quad (3.1)$$

donde NA es el número de alelos detectados por loci.

¹GHISLAIN, M. (2003). Centro Internacional de la Papa (CIP). Lima, Perú. Comunicación personal.

La Diversidad fue calculada utilizando la fórmula de NEI (1987):

$$Diversidad = \frac{n(1 - \sum (p_i^2))}{n - 1} \quad (3.2)$$

en donde n representa el número de individuos analizados, y p_i la frecuencia del alelo i .

Con las distancias genéticas obtenidas con el programa POPGENE, además fueron generados varios dendrogramas a modo de visualizar dichas distancias. También fue usado el programa NTSYSpc para obtener un diagrama de coordenadas principales, basadas en las distancias genéticas de NEI (1978). Estas dos formas gráficas permitieron visualizar la diversidad genética de las papas nativas del sur de Chile y sus relaciones de parentesco; además, permitieron establecer la relación existente entre los grupos filogenéticos que se formaron y las agrupaciones hechas según el origen geográfico de las colectas.

4. PRESENTACION Y DISCUSION DE RESULTADOS

4.1. Amplificación de secuencias microsatélites

Para la elección de los marcadores utilizados en el estudio, se probaron aproximadamente 20 pares de partidores, todos recomendados por el Centro Internacional de la Papa (CIP) para estudios genéticos en la especie, por ser los que presentan una mayor estabilidad y calidad en la amplificación de productos. Otra característica que consideraron para su recomendación es el elevado Índice de Contenido Polimórfico (PIC), el cual es un indicador de cuan polimórfico es el marcador. Además, de estar ubicados en distintos cromosomas de la especie (GHISLAIN *et al.*, 2000; GHISLAIN *et al.*, 2003).

Solamente fueron seleccionados los marcadores con los que se obtuvieron mejores resultados de amplificación en el laboratorio, con accesiones representativas de los distintos grupos. Para los partidores que no amplificaron bien bajo condiciones estándares recomendadas, se modificaron las condiciones de la reacción PCR, como son la temperatura de hibridación de cada par de partidores y la concentración de cloruro de magnesio. Estos dos factores son por lo general responsables de la especificidad de la

técnica. Las concentraciones de $MgCl_2$ variaron entre 0,8 mM y 2 mM, encontrándose una concentración óptima para los 7 pares de partidores seleccionados de 1,6 mM de $MgCl_2$. Las temperaturas de hibridación de cada par de partidores son detalladas en el capítulo de material y método.

A pesar de que los marcadores que se probaron fueron recomendados por las características ya mencionadas, algunos produjeron amplificaciones poco nítidas e incluso algunos fueron inespecíficos en la amplificación (produjeron gran cantidad de bandas), por lo que se seleccionaron siete marcadores dentro de los que mejor amplificaron. Una posible causa de la gran cantidad de fragmentos amplificados por algunos partidores podría ser que éstos amplifiquen más de un locus (GHISLAIN *et al.*, 2003).

4.2. Caracterización molecular de las accesiones de papa

La genotipización de las accesiones de papa, se llevó a cabo separando los productos amplificados mediante PCR en una corrida electroforética en geles de poliacrilamida, y posterior visualización con una tinción de plata. La tinción con plata de ácidos nucleicos es altamente sensible, puesto que pequeñas cantidades de ADN pueden ser visualizados mediante la tinción con esta técnica, aun cuando en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio no sean fácilmente visualizados.

Debido a que se hizo una estimación visual de los fragmentos, no se puede descartar cierto grado de error en la detección de los distintos alelos, sobretodo cuando se diferencian por 1 o 2 pares de bases o cuando aparecen otras bandas mas débiles producto de la inespecificidad de la reacción en algunas muestras. A fin de aminorar este tipo de errores se hizo necesario volver a repetir algunas muestras de difícil evaluación. Debido a la gran cantidad de material analizado y a los altos costos involucrados en la técnica solo se realizó este procedimiento para los casos mas dudosos. Es por este motivo que cobra gran importancia el número de marcadores utilizados en esta tesis.

El análisis de 273 accesiones de *S. tuberosum* ssp. *tuberosum* Hawkes con siete marcadores microsatélites permitió distinguir un patrón genético único para el 99,2% de las accesiones. Lo anterior permite afirmar que el banco de germoplasma chileno de papas tiene un muy bajo número de duplicados. Estos resultados ratifican los trabajos previos de eliminación de duplicados, primero con análisis anatomorfológicos (CONTRERAS, 1969) y luego con electroforesis de proteínas y esterasas (MACIAS, 1986; MACIAS *et al.*, 1989; CONTRERAS y MANCILLA, 1989; JOPIA, 1997).

Estas técnicas en base a marcadores de tipo bioquímico permiten hacer una certera identificación entre accesiones de papa, reduciendo de ésta forma el número de muestras a evaluar con marcadores que detecten un mayor polimorfismo, para determinar la diversidad genética y establecer relaciones de parentesco del material disponible (CAMPOS y SALVO, 1995).

Las Figuras 5 y 6 presentan el patrón de amplificación de dos de los marcadores empleados en el estudio.

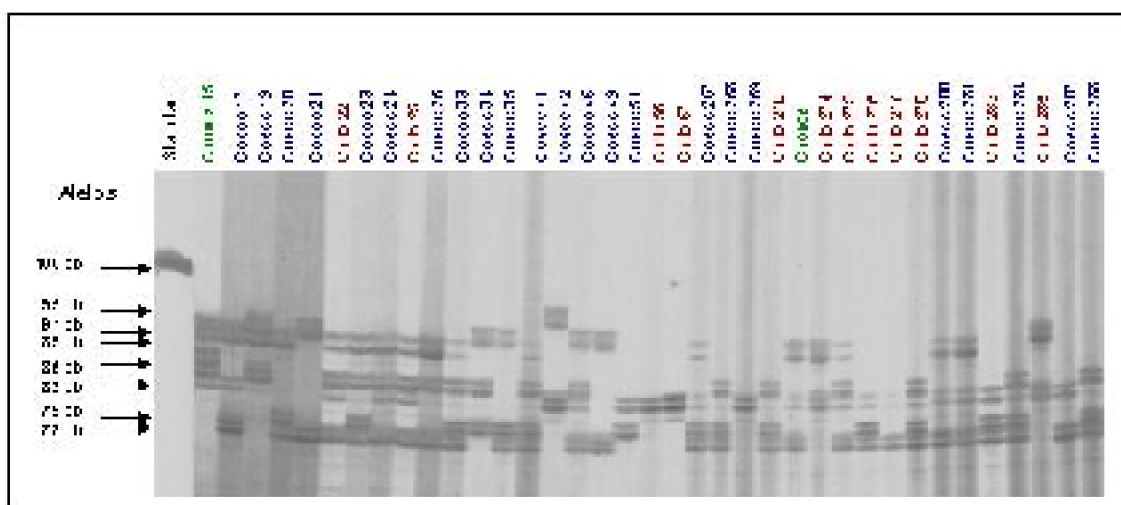


FIGURA 5. Alelos amplificados en accesiones de *Solanum tuberosum* ssp *tuberosum* del sur de Chile con el marcador microsatélite S042 separados en gel de poliacrilamida al 6%. A la izquierda se indica el Standard (marcador de peso GeneRuler 50 bp., Fermentas) y el tamaño de alelos en pares de bases (pb).

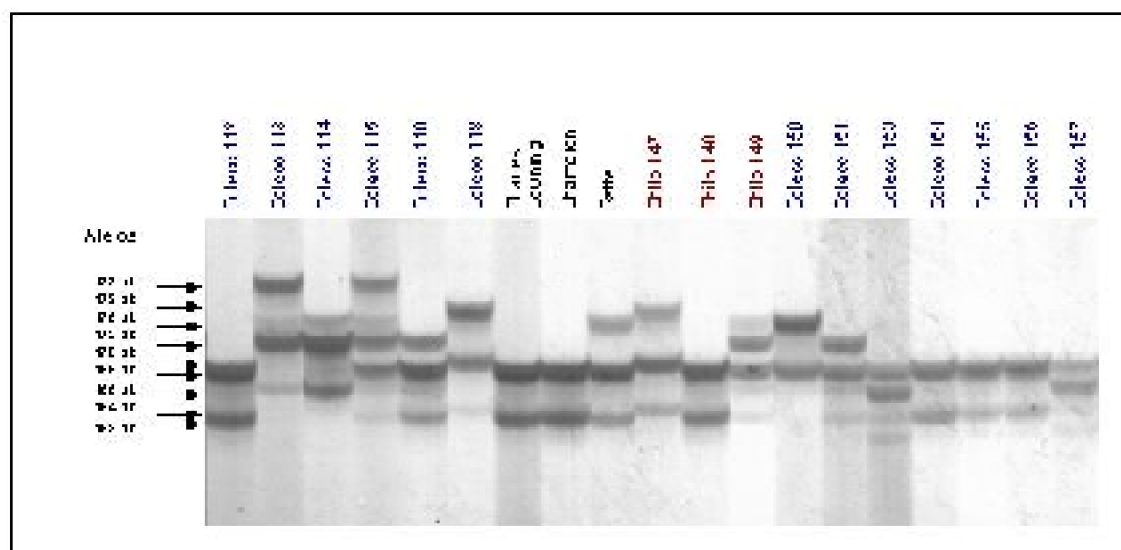


FIGURA 6. Alelos amplificados en accesiones de *Solanum tuberosum* ssp *tuberosum* del sur de Chile y variedades europeas antiguas de papa con el marcador microsatélite S081. A la izquierda se indica el tamaño de alelos en pares de bases (pb).

4.2.1. Análisis de la diversidad genética

Para evaluar la diversidad genética de las accesiones de *S. tuberosum* ssp. *tuberosum* se calcularon varios parámetros de diversidad, siendo los más importantes: alelos totales, alelos por locus, heterocigosidad y diversidad según NEI (1978).

4.2.1.1. Número de alelos. Se analizaron un total de 273 accesiones de *S. tuberosum* ssp. *tuberosum* Hawkes, con siete marcadores microsatélites (SSRs) del núcleo. El

material estuvo conformado por accesiones de papa colectadas en el sur de Chile, representada por los grupos Chiloé, Chonos y Colección, además de las variedades antiguas europeas denominadas Europeas, las que conjuntamente generaron un total de 69 variantes alélicas, con tamaños aproximados que variaron entre los 30 y 280 pb., todas las cuales estuvieron presentes en el material nativo del sur de Chile.

El grupo que presentó la mayor cantidad de alelos fue Colección con 65, correspondientes a un 94,2% del total de alelos detectados (69 alelos). Chonos generó 44 alelos, y Europeas 40 (Figura 7). Estos representan el 63,7% y el 57,9% respectivamente, de la totalidad de alelos encontrados para los cuatro grupos. Sin embargo, los alelos de los grupos Chonos y Europeas estuvieron en su totalidad presentes en el grupo Colección.

Por otra parte, en el grupo Chiloé se detectaron 54 alelos, equivalentes al 78,2% de los alelos totales. De los alelos presentes en el grupo Chiloé solo 50 (92,6% de los alelos de Chiloé) fueron compartidos con el grupo Colección, de esta forma Chiloé constituiría una fuente de alelos únicos o exclusivos, los que corresponden a cuatro alelos. De igual modo, Colección presentó alelos que fueron exclusivos del grupo, equivalentes a 13 alelos.

En el caso del grupo Chonos, 43 de los 44 alelos detectados para el grupo, estuvieron presentes en las variedades típicamente chilotas (97,6% de los alelos del grupo Chonos). En el grupo Chiloé también se encontraron 38 de los 40 alelos de las variedades antiguas europeas (95% de los alelos del grupo Europeas). Por su parte, de los alelos presentes en las variedades de Chiloé, un 79,6% se encontró también en Chonos y un 70,3% en Europeas.

Chonos comparte 37 de los 40 alelos presentes en Europeas, solamente tres alelos de Europeas no fueron encontrados en Chonos, sin embargo, Chonos presentó una mayor número de alelos (siete) que no están presentes en las antiguas variedades cultivadas en Europa.

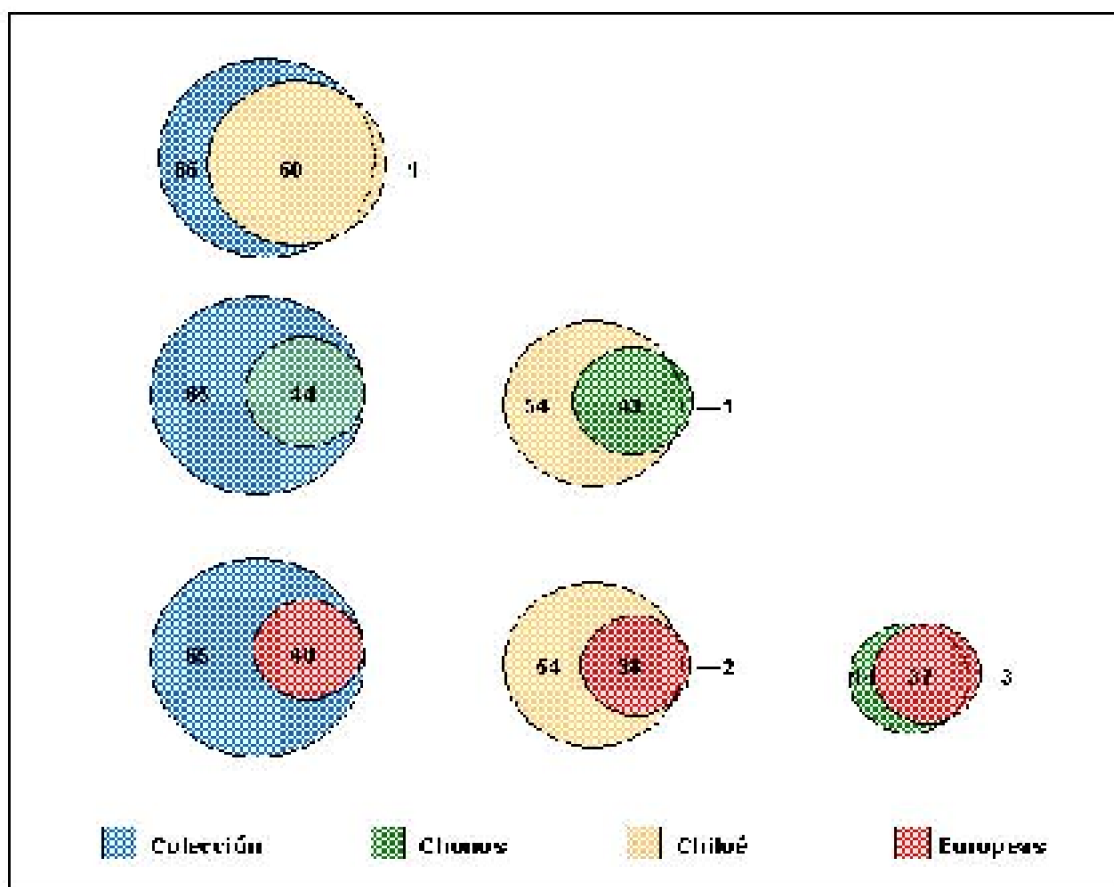


FIGURA 7. Total de alelos por grupo detectados en accesiones de papas nativas del sur de Chile (Colección, Chonos y Chiloé) y cultivares antiguos europeos, además del grado de asociación entre ellos en base a alelos compartidos.

La gran cantidad de alelos totales y alelos únicos encontrados en el grupo Colección, tendría relación con el hecho de presentar la mayor cantidad de individuos ($n=197$), con material colectado en distintos lugares del sur de Chile, entre las cuales se encuentran también accesiones colectadas en la Isla de Chiloé pero que no fueron clasificadas como típicamente chilotas. Lo anterior indicaría que el gran número de alelos detectados depende en gran parte de la cantidad y diversidad del germoplasma muestreado (MATUS y HAYES, 2001).

De un total de 69 alelos obtenido por todos los grupos, un 42% de estos alelos fueron únicos de las accesiones nativas de Chile y por lo tanto no se encontraron en las variedades europeas. El grupo que presentó la mayor cantidad de alelos que no estuvieron presentes en el material europeo fue Colección con 38,5%, seguido de los grupos Chiloé con 30% y Chonos con 16%. De este modo la presencia de un gran

número de alelos únicos en la colección de papas nativas de Chile sería un indicador de la diversidad alélica presente en este germoplasma y su potencial como reservorio de nuevos alelos para el mejoramiento del cultivo.

En el Cuadro 2 se aprecia que para las accesiones de papas nativas del sur de Chile, se encontró un promedio de 9,86 alelos por locus. El número de alelos obtenidos por marcador varió entre un rango de 6 para el marcador S039 (STM1058) a 15 alelos para S101(STM1106). Considerando a cada uno de los grupos del germoplasma, se detectaron para la Colección 9,29 alelos por locus, seguido por Chiloé con 7,71 alelos, Chonos y Europeas con 6,29 y 5,7 alelos por locus respectivamente.

En la formación de gran parte de las variedades europeas de papas se menciona a la variedad chilena "Rough Purple Chili", material del cual se generó la mayoría de las variedades más difundidas en Europa y Estados Unidos (SIMMONDS, 1979; BROWN, 1990). Otras variedades que jugaron gran importancia en el mejoramiento son: Daber, Villarroela y Chilote Indianer, entre otras. El uso de estas pocas variedades explicaría la menor cantidad de alelos por locus de las variedades antiguas europeas en comparación al grupo Chiloé y Colección, siendo similar al del material colectado en el Archipiélago de los Chonos. Destacándose este grupo por estar constituido solamente por 11 accesiones.

CUADRO 2. Número de alelos por locus, rango de tamaño de productos de amplificación y alelos promedio por locus para cada grupo de la colección total en estudio.

Número de alelos						
Locus SSR	Chiloé (n=11)	Chonos (n=11)	Colección (n=197)	Fuertes (n=24)	Europeas (n=20)	Tamaño aprox. (pb)
S106	6	4	7	7	3	188-257
S104	12	10	13	13	10	136-192
S101	10	8	13	15	8	30-203
S081	10	7	11	12	7	157-188
S029	5	4	6	7	3	240-280
S039	5	5	6	6	3	104-125
S042	6	6	9	9	6	75-93
Total	54	44	65	69	40	
Promedio	7.71	6.29	9.29	9.86	5.71	

La información generada con el uso de estos siete marcadores en el material nativo de Chile puede ser contrastada con la que se ha encontrado en otras especies de papas cultivadas, como son: *S. phureja*, *S. stenotomum* y *S. tuberosum* ssp. *andigena*

Como lo muestra el Cuadro 3, el número de alelos promedio por locus encontrado en *S. tuberosum* ssp. *tuberosum* de Chile (9,86) es mayor al detectado en las especies *S. stenotomum* y *S. phureja*¹, aunque en esta última especie solamente se analizaron 128 accesiones. Ambas especies cultivadas son diploides, por lo tanto es de esperar encontrar en ellas una menor diversidad alélica que en *S. tuberosum*, puesto que cada individuo puede tener como máximo solo 2 alelos por locus.

¹ GHISLAIN, M. (2003). Centro Internacional de la Papa (CIP). Lima, Perú.

Comunicación personal.

A pesar del mayor número de alelos promedio por locus encontrado en *S. tuberosum* ssp. *andigena* (14 alelos/locus), la información no es suficiente para asegurar que esta subespecie posee una mayor variación alélica que la ssp. *tuberosum*. Las principales razones son que la cantidad de material analizado en las accesiones de la ssp. *tuberosum* de Chile fue muy inferior al analizado en la ssp. *andigena*. El número de alelos va a ser dependiente de la cantidad de individuos analizados, puesto que aumenta la probabilidad de encontrar nuevos alelos que pudieran estar en una frecuencia mas baja dentro de una población.

CUADRO 3. Número de alelos de siete marcadores microsatélites en tres especies de papas cultivadas incluidas dos subespecies.

Especies de papas cultivadas		Locus SSR							Promedio locus
		S106	S104	S101	S081	S029	S039	S042	
	Chiloé (n=41)	6	12	10	10	5	5	6	7,70
<i>S. tuberosum</i>	Chonos (n=11)	4	10	8	7	4	5	6	6,29
ssp. <i>tuberosum</i>	Colección (n=197)	7	13	13	11	6	6	9	9,29
	TOTAL (n=249)	7	13	15	12	7	6	9	9,86
<i>S. stenotomum</i> ¹	(n=237)	4	7	8	6	nd	nd	9	6,80
<i>S. phureja</i> ¹	(n=128)	4	11	8	7	8	3	8	7
<i>S. tuberosum</i>									
ssp. <i>andigena</i> ¹	(n=566)	7	17	14	11	21	nd	nd	14

nd: información no determinada

Un hecho que debe ser destacado es que para algunos de los marcadores estudiados en el material nativo de Chile se encontró un número similar e incluso superior de alelos que para la ssp. *andigena*, a pesar de la menor cantidad de material analizado. Solamente el locus S029 presentó un número muy inferior de alelos, lo cual puede deberse a que este locus en el genoma de la ssp. *tuberosum* podría presentar una baja tasa de mutación, lo que se reflejaría en una menor variación alélica.

¹GHISLAIN, M. (2003). Centro Internacional de la Papa (CIP). Lima, Perú. Comunicación personal.

Se desconoce si los alelos generados por la ssp. *tuberosum* en este estudio corresponden a los mismos encontrados en la ssp. *andigena*. Sin embargo, éstos estuvieron dentro del rango de alelos encontrados para la ssp. *andigena* en el Centro Internacional de la Papa (GHISLAIN, 2003).

RAKER y SPOONER (2002) utilizando algunos de estos marcadores pudieron separar claramente a ambas subespecies de *S. tuberosum*, de modo que estos resultados apoyan las diferencias genéticas entre ambas poblaciones. Las diferencias encontradas entre ambas subespecies, permiten inferir que las dos subespecies presentarían un gran porcentaje de alelos que le son propios.

4.2.1.2. Heterocigosidad. El índice utilizado predice el nivel o grado de

heterocigosidad que presentan en promedio los distintos grupos por loci, considerando que el número de alelos en la especie por ser tetraploide puede ir de uno a cuatro. Los individuos homocigotos, es decir que presentan un solo alelo, tendrán un índice de heterocigosidad igual a 0, en cambio los que presenten el máximo de alelos (cuatro) presentarán un valor igual a 1, es decir 100% de heterocigosidad. Los valores del Índice Relativo de Heterocigosidad se muestran en el Cuadro 4.

Este índice fue muy similar dentro del material chileno, destacándose el grupo Chiloé por sobre los demás, con un valor promedio de 0,525, seguido por Colección (0,475) y Chonos (0,461). Las variedades europeas presentaron un valor levemente inferior (0,449), pero similar a Chonos. De este modo las variedades típicamente chilotas serían las más heterocigotas, al presentar un mayor número de alelos por loci en sus accesiones, encontrándose en estas un promedio de 2,58 alelos por loci. Por su parte los grupos Colección y Chonos presentaron 2,43 y 2,38 alelos por loci respectivamente, valores similares a los presentados en el grupo de las variedades europeas (2,35).

CUADRO 4. Índice relativo de heterocigosidad por locus SSR y promedio, para los grupos Chiloé, Chonos, Colección y Europeas.

Grupo	Índice Relativo de Heterocigosidad (IRH) por locus SSR							IRH promedio por Grupo
	S106	S104	S101	S081	S029	S039	S042	
Chiloé	0.649	0.707	0.407	0.433	0.244	0.626	0.610	0.525
Chonos	0.467	0.700	0.394	0.367	0.182	0.485	0.633	0.461
Colección	0.490	0.810	0.364	0.458	0.212	0.475	0.518	0.475
Europeas	0.304	0.797	0.304	0.472	0.197	0.478	0.594	0.449

Otro índice de heterocigosidad reportado en la literatura, es la heterocigosidad promedio por locus (ALH), definida como la probabilidad de encontrar un individuo heterocigoto dentro de una población. BONIERBALE *et al.* (1993), usando marcadores RFLP, encontró que la heterocigosidad en *S. tuberosum* varió en un rango de 0,477 a 0,502. Mediante el uso de isoenzimas en la colección entera y en una colección base de *S. tuberosum* ssp. *andigena*, HUAMAN *et al.* (2000), encontraron valores de 0,492 y 0,50 respectivamente.

El cálculo de la ALH en el material chileno (Cuadro 5) generó valores de 0,886 para Chiloé, 0,896 para Chonos y 0,880 para Colección, valores levemente superiores a los encontrados en las variedades europeas (0,854). Estos valores revelan un alto porcentaje de individuos heterocigotos dentro de la colección chilena, el cual corresponde a un 88% de los individuos. Sin embargo dentro de éstos, el grupo de las variedades clasificadas como típicamente de Chiloé es el que presentó un mayor grado de heterocigosidad dada por el mayor número de alelos detectados por loci.

A pesar de los altos valores de heterocigosidad arrojados por éste índice en el material nativo, sus datos no pueden ser comparados con los encontrados por los autores anteriormente citados, puesto que la baja heterocigosidad promedio detectada por locus, puede ser explicada básicamente por las características de los marcadores que utilizaron. RFLPS e isoenzimas detectan un polimorfismo por loci muy inferior al detectado por los

marcadores microsatélites.

CUADRO 5. Heterocigosidad promedio por locus para siete locus SSR, y valores promedio para los grupos Chiloé, Chonos, Colección y Europeas.

Grupo	Heterocigosidad Promedio por Locus (ALH) para 7 SSR							ALH promedio por Grupo
	S106	S104	S101	S081	S029	S039	S042	
Chiloé	0.973	0.952	0.952	0.756	0.643	1.000	0.929	0.886
Chonos	1.000	1.000	0.818	1.000	0.455	1.000	1.000	0.896
Colección	0.943	0.995	0.929	0.861	0.518	1.000	0.918	0.880
Europeas	0.783	1.000	0.826	0.917	0.545	1.000	0.913	0.854

Los autores RAKER y SPOONER (2002), en un estudio realizado con *Solanum tuberosum* (2 subespecies) y otras especies diploides utilizando microsatélites, encontraron que el porcentaje de heterocigotos fue de 57% en la ssp. *tuberosum*, y de 51% en la ssp. *andigena* (significativamente iguales). Sin embargo, el número de alelos medios por individuos fue significativamente diferente entre las dos subespecies, 1,70 y 1,57 para ssp. *tuberosum* y ssp. *andigena* respectivamente.

La menor cantidad de individuos heterocigotos encontrados en la ssp. *tuberosum* por los autores anteriormente citados, en comparación al alto valor encontrado en este estudio (88% de los individuos) puede deberse a que los autores solamente utilizaron 36 accesiones, las que probablemente no son representativas de la colección que se mantiene en la Universidad Austral de Chile.

Este mismo índice de heterocigosidad a sido utilizado en otra especie poliploide de gran importancia como el camote. La heterocigosidad actual en *Ipomoea batatas* (L.) Lam. varió ampliamente, fluctuando entre 0,31 y 0,92, con una media de 0,60, valor considerado razonable por los autores por tratarse de una especie hexaploide de polinización cruzada (ZHANG *et al.*, 2000).

Los valores relativamente altos de heterocigotos en la población de papas nativas de Chile (88%) en comparación a camote (60%) revelan la alta heterocigosidad de *S. tuberosum* ssp. *tuberosum*. Esto, sin embargo, no concuerda con lo asegurado por ZHANG *et al.* (2000), quienes afirman que por lo general la papa es menos heterocigota que el camote.

La papa es una planta heterocigota, característica que contribuye a su extrema diversidad genética y ha sido probablemente un factor clave en su sobrevivencia. La heterocigosidad en papa se atribuye a su autoincompatibilidad, la que ha sido probablemente realizada por miles de años de reproducción asexual de tubérculos (NSF POTATO GENOME PROJECT, 2004).

La teoría de la máxima heterocigosidad sugiere que el vigor en autopoliploides es altamente dependiente de la diversidad intra locus. Por consiguiente, genotipos con una alta frecuencia de tetra o trialelos podrían ser superiores en vigor a los que son altamente di o monoalélicos. Tal ventaja puede tener implicancias en la evolución de las especies poliploides, y se hacen esfuerzos para explotarlos en la mejora del cultivo (BONIERBALE,

1993).

Según BROWN (1990), los resultados indican que la depresión por “inbreeding” (homocigosis) en papa puede ser severa, razón por la cual, una innovación en el mejoramiento moderno de la papa en las últimas décadas ha sido enfocado en el incremento de la heterocigosis como una medida para aumentar los rendimientos.

4.2.1.3. Diversidad. En el Cuadro 6 se muestra que la diversidad genética, calculada según NEI (1987) para cada locus SSR presentó diferencias entre marcadores, siendo el marcador S029 (STPac58) el que generó la menor diversidad para todos los grupos, con un valor promedio de 0,57, por el contrario el más diverso fue el S104 (STM2013) con una diversidad promedio para todos los grupos de 0,88. La diversidad promedio por grupo considerando los siete loci analizados, no difirió mucho, encontrándose que el grupo más diverso fue Chonos (0,818), seguido de Chiloé (0,781), Colección (0,745) y Europeas (0,736). Presentando el grupo Chonos valores de diversidad genética superiores a los demás prácticamente con todos los marcadores.

CUADRO 6. Valores de Diversidad genética por locus SSR y promedio para los grupos Chiloé, Chonos, Colección y Europeas.

Grupo	Diversidad genética por locus SSR							Diversidad prom. por Grupo
	S106	S104	S101	S081	S029	S039	S042	
Chiloé	0.801	0.881	0.815	0.863	0.562	0.733	0.813	0.781
Chonos	0.814	0.932	0.920	0.862	0.571	0.721	0.904	0.818
Colección	0.738	0.857	0.790	0.807	0.566	0.647	0.807	0.745
Europeas	0.643	0.865	0.740	0.830	0.571	0.659	0.844	0.736

La diversidad es un valor que depende del número de alelos detectados y la frecuencia de estos alelos. Este índice de diversidad genética no se ve afectado por el tamaño de la muestra puesto que ésta es considerada en su cálculo. Un grupo de alta diversidad será aquel que presente un gran número de alelos de frecuencias similares y en un reducido número de individuos.

PROVAN *et al.* (1999), encontraron valores de diversidad de 0,76 a 0,78 usando SSR nuclear en variedades europeas modernas de papa. Estos valores de diversidad son superiores a los encontrados en el grupo Europeas (0,736), lo que probablemente se debe a un aumento de la diversidad de las variedades modernas cultivadas debido a la introgresión de genes desde otras especies cultivadas y silvestres de papa en las últimas décadas de mejoramiento (ESTRADA, s/f; BROWN, 1990).

El cultivar chileno “Rough Purple Chili” y sus cultivares derivados fueron extensamente usados como parentales femeninos en los programas de mejoramiento genético, probablemente por su alta esterilidad polínica. Sin embargo, esto fue acompañado de un alto nivel de diversidad paternal. Esta última razón sería la causa de la alta diversidad encontrada hoy en día en las variedades europeas modernas. No obstante esto trajo como consecuencia una gran disminución de la diversidad a nivel del citoplasma (PROVAN *et al.*, 1999).

Los altos valores de diversidad genética encontrados en el material de papas nativas

de Chile, donde destacan accesiones colectadas en el Archipiélago de los Chonos y variedades típicamente chilotas por sobre las variedades antiguas europeas, utilizadas como referencia, además del gran número de alelos/locus y alto grado de heterocigosidad del material, evidencian la alta diversidad genética y valor de las accesiones de papas mantenidas en el banco genético de la Universidad Austral de Chile.

Estos resultados permiten desmentir lo señalado por GLENDINNING (1975) y GLENDINNING (1978), con respecto a que las papas nativas de Chile son un material de una base genética muy estrecha y por lo tanto sería de poca utilidad para ser utilizado en mejoramiento. Correspondiendo esta a una opinión que carece de cualquier tipo de estudio científico que lo acredite.

4.3. Distancias genéticas

Con el propósito de establecer las relaciones de parentesco entre el material analizado, se calculó una matriz de distancias genéticas de NEI (1978), entre cada uno de los individuos analizados, utilizando el software POPGENE versión 3.2.

Para estimar de forma visual las distancias genéticas entre los grupos e individuos se obtuvo un dendrograma con base en la matriz de distancias y generado con el mismo programa.

4.3.1. Distancia genética entre grupos. Las distancias genéticas fueron muy bajas entre los grupos. La mayor distancia se produjo entre Chiloé y Europeas (0,01), y la menor entre Colección y Europeas (0,0006). El grupo Chonos presentó igual distancia con Chiloé y Colección (0,0034) pero fue mas distante de las variedades europeas (0,0063).

En la Figura 8 se grafica las distancias genéticas existentes entre las papas nativas de Chile y las variedades europeas.

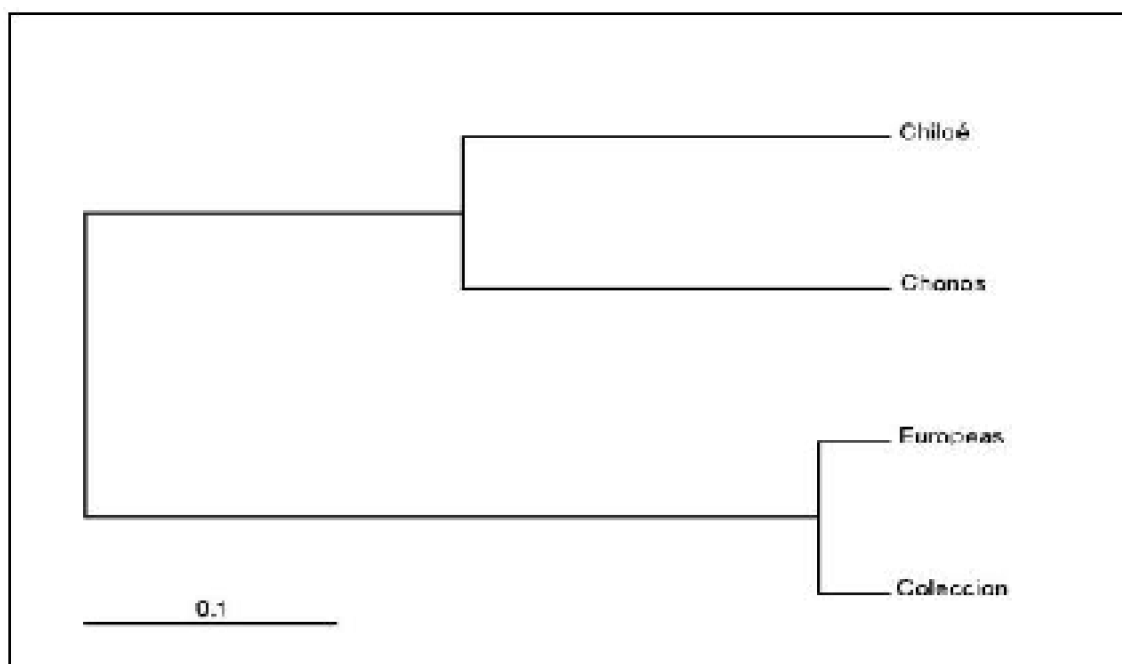


FIGURA 8. Dendrograma de los grupos Chiloé, Chonos, Colección y var. Europeas obtenido de las distancias genéticas (NEI, 1978) producto de la variación alélica de siete marcadores microsatélites.

Las bajas distancias entre los grupos evidencian el gran parentesco que existe entre las accesiones originarias de Chile y las variedades antiguas europeas. Las mayores distancias, sin embargo, se presentaron entre los individuos analizados.

4.3.2. Distancias genéticas entre individuos. Debido a que la mayor diferencia se produjo entre las accesiones de los distintos grupos, para apreciar visualmente las distancias genéticas entre las accesiones de papas nativas de Chile y las variedades antiguas europeas, se realizó un análisis de coordenadas principales con el Software NTSYSpc versión 2.11Q, el cual se muestra en la Figura 9, con un diagrama en dos dimensiones.

Como se observa en el diagrama, no existe una formación de grupos claramente separados según el lugar geográfico donde fueron colectadas las accesiones de papas nativas de Chile, ni el origen como en el caso de las variedades europeas.

La mayor distancia genética entre accesiones, se presentó entre la variedad europea Ratte y Colecc 102, individuo colectado en la Isla de Chiloé, con un valor de 0.833. Por otro lado la menor distancia tuvo un valor de 0.0146, la que se detectó entre las accesiones Chilo53 (Guapa, Chiloé) y Colecc 55 (Cacho rapa, Gorbea); Chilo323 y Colecc 162 (NG 54); Chilo323 y Colecc 266; Colecc 06 (Cochrane) y Colecc 10 (Cochrane); Colecc 87 (Rosa, Chiloé) y Colecc 94 (Chauquina, Chiloé); Colecc 87 y Colecc 171 (NG 78); Colecc 95 (Cielo, Chiloé) y Colecc 102 (Chiloé); Colecc 101 (Mata roja, Chiloé) y Colecc 109; Colecc 154 (NG 28) y Colecc 163 (NG 55); Colecc 155 (NG 30) y Colecc 156 (NG 33); Colecc 167 (NG 65) y Colecc 192 (NG 117); Colecc 227 y Colecc 240 (Llanquihuana, Chiloé); y Colecc 301 con la variedad President.

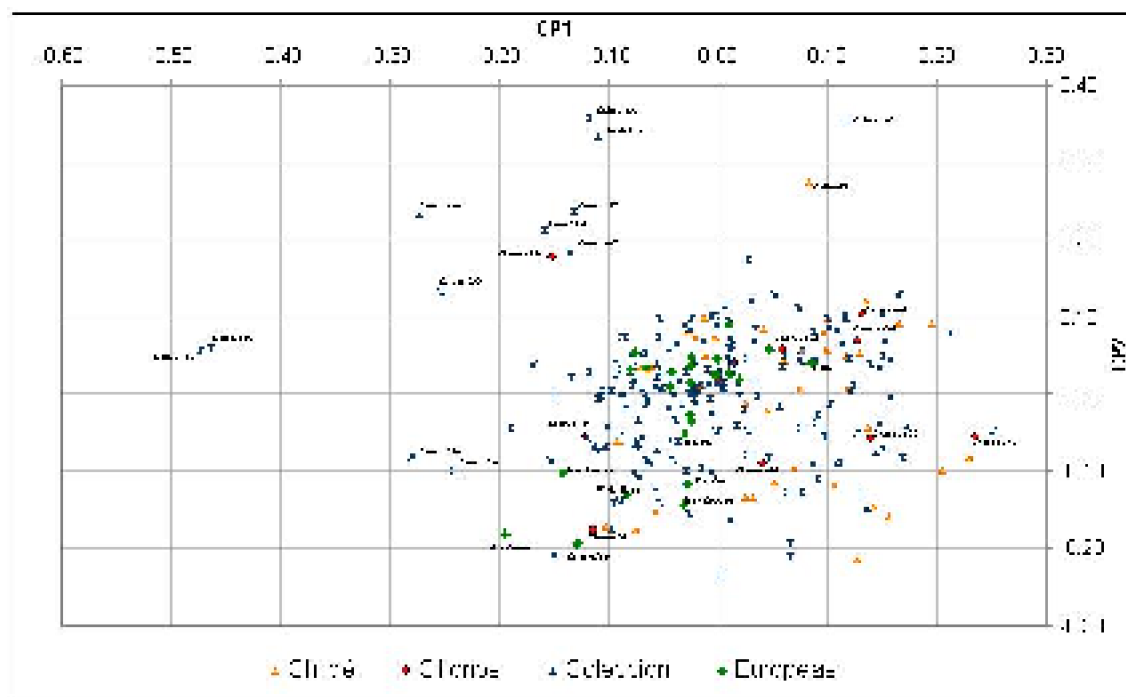


FIGURA 9. Diagrama de coordenadas principales para 249 accesiones de *S. tuberosum* ssp. *tuberosum* nativas del sur de Chile y 24 cultivares antiguos europeos, basadas en la distancias genéticas generadas con siete marcadores microsatélites.

Dentro de las papas nativas de Chile se encontraron solamente dos accesiones que presentaron el mismo patrón genético con otra accesión, para los siete marcadores estudiados. Las accesiones Colecc 24 con Chilo25 y Chilo253 con Chilo255 correspondieron al único material duplicado dentro de la colección analizada.

La baja distancia entre algunos individuos, denota la existencia de material con una altísima similitud genética. Cabe la posibilidad que un pequeño número de estos individuos con similitudes de aproximadamente 98,5% correspondan a duplicados que no fueron identificados como tal, por algún error en la evaluación. Sin embargo, también es posible que al utilizar un mayor número de marcadores estas diferencias se hagan mas marcadas. Un hecho destacable es la gran similitud genética entre la variedad europea President y la accesión Colecc 301. Lamentablemente no es posible, ni técnica , ni económicamente analizar todos los genes de una especie en este tipo de estudios.

Otro factor que puede contribuir a que existan algunas diferencias en la estimación de distancias genéticas, es que para la construcción de la matriz de distancias, fueron consideradas, de igual forma, algunas accesiones que no presentaban información para uno de los siete marcadores, de modo que estas distancias en algunos casos podrían cambiar levemente.

La gran mayoría de los individuos del grupo Colección se encuentran agrupados con las variedades de Chiloé, cultivares europeos y accesiones de los Chonos, sin embargo, el grupo Colección presenta algunos individuos que se encuentran más distanciados genéticamente del resto del material estudiado.

Estas accesiones más distanciadas del grupo principal son Colecc 192 (NG 117), Colecc 167 (NG 65), Colecc 200 (NG 136), Colecc 197 (NG 129) y Colecc 198 (NG 130). Dos accesiones que se ven distanciadas del resto (lado izquierdo del diagrama) y muy similares genéticamente entre si, son Colecc102 y Colecc095 ambas colectadas en Chiloé y la última denominada con el nombre común de "Cielo". Otras accesiones que también destacan por aparecer distantes en el diagrama son Colecc110 denominada "Clavela redonda", colectada en Chiloé y Colecc222 denominada "Clavela" y colectada cerca del Lago Rosselot (Región de Aisén).

En el gráfico de coordenadas principales además claramente se observa que el material colectado en el Archipiélago de los Chonos tiene una buena distribución a través del plano, lo que tiene relación con el hecho de ser el grupo de mayor diversidad genética, junto con ser el que presenta el menor número de individuos analizados. Una situación de amplia distribución en el plano, puede ser observada también en las variedades típicamente chilotas.

Por otra parte, la gran mayoría de los cultivares antiguos europeos, se encuentran altamente emparentados con las papas originarias del sur de Chile, principalmente con el grupo Colección y en menor grado con los grupos Chonos y Chiloé.

No obstante, mediante el dendrograma de la Figura 10, que considera solamente las variedades de Chiloé, material colectado en los Chonos y cultivares europeos se aprecia que existe la formación de grupos, los que son independientes del lugar de procedencia de las accesiones agrupadas en esta tesis.

La variedad europea Ratte es separada completamente de las papas nativas de Chile y de las restantes variedades europeas, evidenciando una marcada diferencia genética con respecto al material en estudio, pudiendo deberse a un origen genético diferente al de la mayoría de las antiguas variedades europeas, que tienen como ancestro común a la Púrpura Casposa de Chile. La menor distancia genética entre Ratte y las accesiones de la Figura 10 se presentó con Chilo263 y Champion, con un coeficiente de 0.302 (Anexo 5).

La variedad Institut de Beauvais con Chonos104 formaron un grupo principal, en tanto un segundo grupo estuvo constituido por el resto de las accesiones de Chiloé, Chonos y variedades europeas, los que a su vez se subdividieron en varios subgrupos menos definidos.

En el caso de las variedades europeas, es posible apreciar la formación de un grupo

en el cual se encuentran varias de estas variedades, tal es el caso del grupo formado por Flourball, Green Mountain, Abundance, Charles Downing y Early Rose, entre otras. En este grupo también encontramos algunas variedades chilotas como Chilo263, Chilo64 y Chilo73. El resto de las variedades fue agrupado de manera independiente con variedades chilotas y accesiones de los Chonos.

4.3.3. Distancias dentro de los grupos. La Figura 11 muestra el dendrograma obtenido con las variedades típicamente chilotas. La mayor distancia genética se encontró entre Chilo50 (Huemula) y Chilo79 (Metalqui) (Anexo 6), con una diferencia de 52% (0.5205) entre ambas accesiones, en tanto que la menor distancia se presentó entre Chilo64, Chilo73 (Chauquina) y Chilo263 con una distancia entre cada una de ellas de 0.0294, igual distancia también se encontró entre las accesiones Chilo257 y Chilo258.

En este grupo, se encontraron dos variedades genéticamente idénticas para todos los marcadores usados, correspondiendo a las accesiones Chilo 253 y Chilo 255. Ambas variedades producen tubérculos alargados, de piel morada y pulpa de igual color, denominadas localmente con el nombre de Negra.

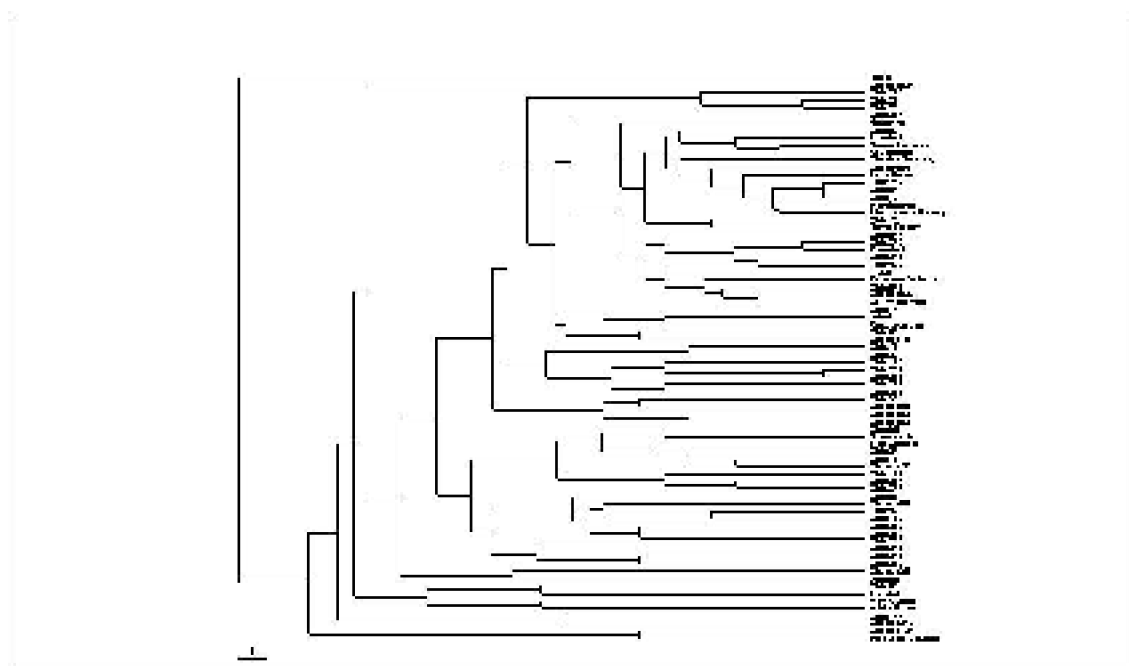


FIGURA 10. Dendrograma de accesiones de *S. tuberosum* ssp. *tuberosum* originarias de la Isla de Chiloé, Archipiélago de los Chonos y variedades antiguas europeas obtenido por la variación alélica de siete marcadores microsatélites.

En el dendrograma se puede apreciar la formación clara de dos grupos principales, en uno de ellos la accesión Chilo66 (denominada localmente Inverniza) formó un grupo completamente separado del resto de las variedades chilotas, lo cual se debe al hecho de presentar en general una alta distancia genética con cada una de las restantes variedades de este grupo, con un rango de 0,245 a 0,52. El segundo gran grupo, reunió todas las restantes variedades, dentro del cual se puede apreciar la formación de algunos subgrupos no tan bien diferenciados entre sí.

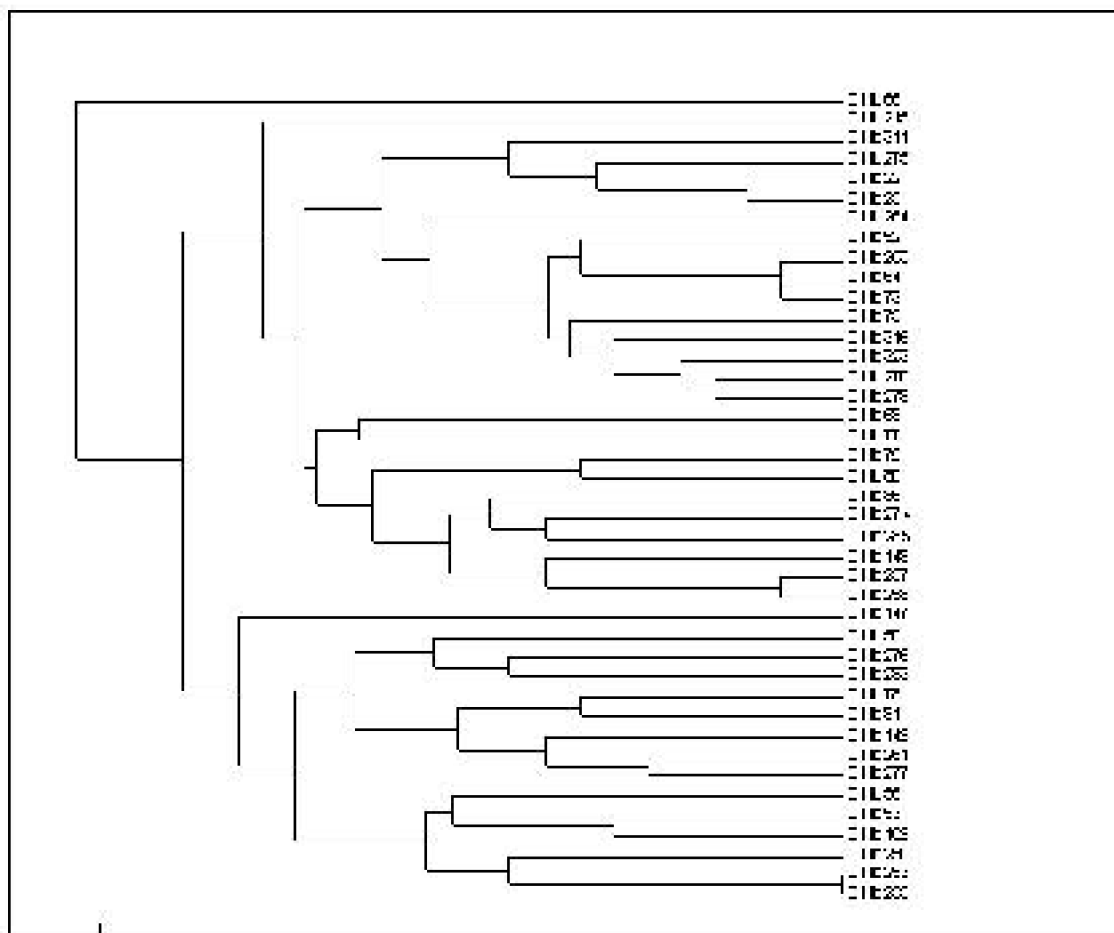


FIGURA 11. Dendrograma de 41 variedades típicamente chilotas (grupo Chiloé) obtenido en base a las distancias genéticas de NEI (1978) mediante la variación alélica de siete SSRs.

Al comparar las características de los tubérculos (básicamente color de piel y pulpa) de las variedades típicamente chilotas (Anexo 1), con los resultados arrojados por el dendrograma, se aprecia que no existe una relación entre los grupos de parentesco y las características del tubérculo, esto porque la cantidad de genes involucrados en estas dos características son reducidos (DE JONG *et al.*, 2003; DE JONG *et al.*, 2004).

Variedades de piel y pulpa blanca o color crema, como Chilo25, Chilo79, Chilo80, Chilo283 y Chilo315 fueron agrupadas independientemente con variedades de piel y pulpa pigmentada, que constituyen la mayoría del material de este grupo. Las variedades que presentaron las menores distancias genéticas entre si, comparten las mismas características del tubérculo, salvo dos variedades que difieren en un 4,45% Chilo22 (tubérculos ovalados, piel morada) y Chilo25 (tubérculos ovalados, piel blanca).

La diversidad genética dentro del grupo de papas nativas colectado en el archipiélago de los Chonos es visualizada en el dendrograma de la Figura 12. Las accesiones mas distanciadas genéticamente entre si son Chonos104 y Chonos272 con una distancia de 0.623 (Anexo 7), mientras que las que comparten un mayor grado de similitud son Chonos62 y Chonos63, con una distancia de 0.123.

La accesión Chonos104 formó un grupo separado del resto, presentando una marcada separación con las demás accesiones del grupo, con distancias que variaron en un rango de 0.342 a 0.623. En tanto, Chonos272 que también formó un subgrupo en forma individual, presentó valores de distancia genética con los restantes individuos que variaron de 0,245 a 0,623. Los valores de distancia genética, relativamente altos, encontrados en general entre todos los individuos del grupo Chonos, evidencian la alta diversidad genética de este grupo, el que se encuentra representado por un número reducido de individuos.

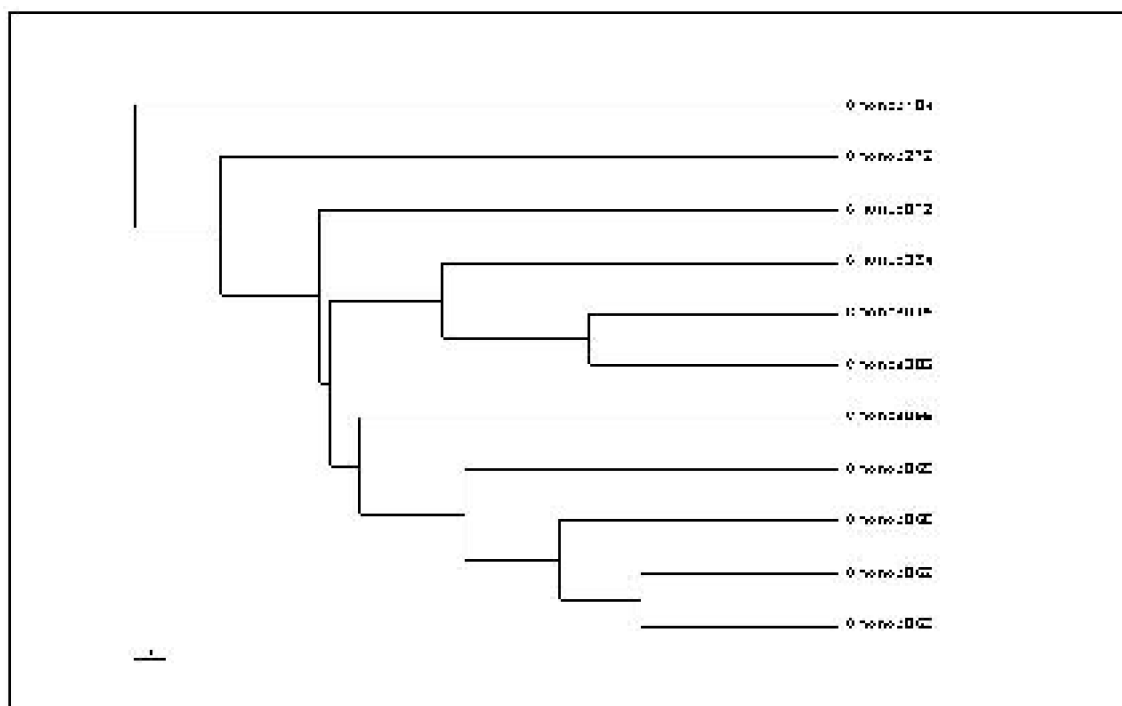


FIGURA 12. Dendrograma de 11 accesiones de papas colectadas en el Archipiélago de los Chonos obtenido en base a las distancias genéticas (NEI, 1978) mediante la variación alélica de siete SSRs.

Entre las variedades antiguas europeas, el mayor parentesco se presentó entre las variedades Green Mountain y Abundance, con una distancia de 0.06, esta misma distancia también se encontró entre Wohltmann e International Kidney (Anexo 8). Por el contrario las más divergentes entre si, fueron May Queen y Ratte, con una distancia de 0.623. Otras variedades que presentaron una alta distancia con Ratte, son Fortyfold e Institut de Beauvais, ambas con un coeficiente de 0.59

Como se observa en el dendrograma de la Figura 13, la variedad Ratte es separada del resto de las variedades antiguas europeas, lo que podría deberse al hecho de tener un origen genético diferente al de las restantes variedades, posiblemente sea

El cultivar Early Rose, que forma parte del grupo más emparentado de variedades, es descendiente en forma directa de la variedad chilena Rough Purple Chili, y llegó a ser ampliamente utilizado como parental en programas de mejoramiento, siendo un ancestro en el pedigrí de muchas variedades europeas (BROWN, 1990).

Esto último queda de manifiesto al observar el dendrograma, justamente, en el grupo que presenta el mayor grado de parentesco, se encuentran algunas de las variedades a las que ha dado origen el cultivar Early Rose. En el caso de Charles Downing como parental femenino, y participando en la formación de las variedades Early Vermont, Abundance, Green Mountain y President (WAGENINGEN UNIVERSITY, 2004).

La variedad Paterson Victoria según indica SIEBENEICK (1948), es una antigua variedad inglesa, introducida en el siglo XVII desde Chile a Irlanda, y de allí algo después a Inglaterra. El nombre de esta variedad fue dado a más de un individuo, aunque todas de origen británico y obtenidas a mediados del siglo XIX, una de ellas descendiente de la variedad Fluke y otra de origen desconocido, pudiendo descender de la antigua variedad introducida desde Chile.

Otra variedad importante en la formación de antiguas variedades europeas, es Daber, que según la opinión de HAWKES (1956), GLENDINNING (1975) y PLAISTED y HOOPES (1989), pertenece probablemente a una antigua variedad cultivada de Chile introducida a Europa alrededor de 1830. De hecho, esta variedad constituye el material parental de las variedades de origen alemán, Reichskanzler y Wohltmann.

Estos antecedentes, junto con el alto grado de parentesco encontrado entre las papas nativas de Chile y las variedades antiguas europeas, utilizadas como referencia en esta tesis, permiten evidenciar el gran aporte genético que han hecho las papas originarias del Sur de Chile a la formación de las antiguas variedades europeas.

5. CONCLUSIONES

- Mediante marcadores moleculares del tipo microsatélites fue posible generar polimorfismo en la amplificación de siete loci, con cuya información se pudieron determinar varios parámetros de diversidad genética en las papas nativas del sur de Chile.
 - Un número elevado de alelos/locus en el material nativo de Chile en comparación a las variedades antiguas europeas y otras especies de papa cultivada permiten evidenciar la alta diversidad alélica del material en estudio.
 - De la totalidad de alelos encontrados en las accesiones de papas nativas de Chile, un alto número de éstos fueron exclusivos de las papas chilenas, correspondiendo a un 42% del total encontrado.
 - El germoplasma de papas mantenido en la Universidad Austral de Chile, posee un altísimo porcentaje de individuos heterocigotos (88%), presentando éstos, un elevado grado de heterocigosidad por locus.
 - Se cuantificó la diversidad genética según NEI (1987), encontrándose los valores más altos en las papas nativas de Chile, en comparación a las variedades europeas.
 - Dentro del material nativo, el grupo de accesiones colectadas en el Archipiélago de los Chonos resultó ser el de mayor diversidad genética, destacando por ser el de menor número de individuos.
 - Los bajos valores de distancia genética entre grupos, junto con una alta variación entre individuos, no permitieron agrupar a las papas nativas de Chile, colectadas en

distintos lugares del sur del país y a las variedades antiguas europeas, según el lugar geográfico de origen.

- El gran parentesco entre el grupo Europeas y las papas nativas del sur de Chile, evidencian el aporte genético de las papas de Chile a la formación de las antiguas variedades europeas.

- La colección estudiada posee un bajísimo número de duplicados (0.8%), no obstante se encontraron algunos individuos muy similares genéticamente entre sí, con similitudes cercanas al 99%.

- Todos los parámetros de diversidad genética determinados en las papas nativas del sur de Chile, permiten afirmar que este material genético mantenido en la Universidad Austral de Chile es de alta diversidad, poniendo de manifiesto el gran valor que presenta para ser utilizado en los programas de mejoramiento.

BIBLIOGRAFIA

- BECERRA, V. y PAREDES, M. 2000. Uso de marcadores bioquímicos y moleculares en estudios de diversidad genética. *Agricultura Técnica (Chile)* 60(3): 270-281.
- BONIERBALE, M., PLAISTED, R. y TANKSLEY, S. 1993. A test of a maximum heterozygosity hypothesis using molecular markers in tetraploid potatoes. *Theor. Appl. Genet.* 86: 481-491.
- BROWN, C. 1990. Modern evolution of the cultivated potato gene pool. In: Vayda, M. y Parrk, W. (eds). *The molecular and cellular biology of the Potato*. CAB International. Wallingford, UK. pp: 1-11.
- BRYAN, G., DE JONG, W., PROVAN, J., MILBOURNE, D., MC NICOLL, J., DAVIDSON, J., RAMSAY, G. y WAUGH, R. s.f. Potato genomics: a general strategy for the molecular genetic characterisation of *Solanum* germplasm. *Breeding and genetics (U.K.)*. pp: 101-104.
- BUKASOV, S. 1939. The Origin of Potato Species. *Phycis (Argentina)* 18: 41-46.
- CAMPOS, H. 1995. Marcadores moleculares: conceptos. *Agro Sur (Chile)* 23(1): 68-75.
- CAMPOS, H. y SALVO, H. 1995. Marcadores moleculares: aplicaciones al mejoramiento genético de plantas. *Agro Sur (Chile)* 23(2): 185-195.
- CENTRO INTERNACIONAL DE LA PAPA (CIP). 1999. Molecular biology laboratory protocols: plant genotyping (On line). Ghislain, M., Zhang, D. y del Rosario, M. (eds.). < <http://www.cipotato.org/Training/Materials/Molecular/Molecular9.pdf> >

- (11agos.2003).
- CONTRERAS, A. 1969. Análisis y pauta de clasificación de clones de papa recolectados en el sur de Chile. Tesis Lic. Agr. Valdivia. Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias. 140 p.
- CONTRERAS, A. 1978. Germoplasma chileno de papas. Agro Sur (Chile) 6: 109-110.
- CONTRERAS, A. y RAMIREZ, M. 1978. *Solanum* Series Etuberosa collecting in Chile. Plant Genetic Resources, Newsletter. 35: 11-13.
- CONTRERAS, A., BANSE, J., FUENTEALBA, J., MANQUIAN, N. y ASENJO, F. 1979. Informe anual 1979 del germoplasma chileno de papas. Instituto de Producción y Sanidad Vegetal, Universidad Austral de Chile. Serie A-4. 43p.
- CONTRERAS, A., ARUTA, C. y RUSCHE, H. 1980. Estudio y proyección del germoplasma chileno de papas. Simiente (Chile) 50(1-2): 57-63.
- CONTRERAS, A. y MONTALDO, P. 1985. Recursos fitogenéticos del altiplano antofagastino. Simiente(Chile) 55: 195.
- CONTRERAS, A., HUAMAN, Z. y MONTALDO, P. 1986. Recolección de papas en Chile. Bull. Plant Genetic, FAO. 65: 31-33.
- CONTRERAS, A. y THOMANN, R. 1986. Prospección de recursos fitogenéticos del norte de Chile. IDESIA (Chile) 10: 61-64.
- CONTRERAS, A. 1987. Germoplasma chileno de papas (*Solanum spp.*). In: Contreras, A. y Esquinas-Alcázar, J. (eds). Anales del Simposio Recursos Fitogenéticos, Valdivia. Universidad Austral de Chile-International Board for Plant Genetic Resources (UACH-IBPGR). pp: 43-75.
- CONTRERAS, A. y MANCILLA, R. 1989. Electroforesis de proteínas y esterasas como método químico de identificación en papas. Turrialba (Costa Rica) 39(2): 193-198.
- CONTRERAS, A., CIAMPI, L., PADULOSI, S. y SPOONER, D. 1993. Potato germplasm collecting expedition to the Guaitecas and Chonos Archipiélagos, Chile. Potato Research 36: 309-316.
- CONTRERAS, A. 2000. Colectas de *Solanum* en Chile y su manutención. In: Congreso Iberoamericano de investigación desarrollo en patata. España. 350 p.
- DE JONG, W., DE JONG, D., DE JONG, H., KALAZICH, J. y BODIS, M. 2003. An allele of dihydroflavonol 4-reductase associated with the ability to produce red anthocyanin pigments in potato (*Solanum tuberosum* L.). Theor. Appl. Genet. 107: 1375-1383.
- DE JONG, W., SUK JUNG, C., DE JONG, D., SUNG KIM, T. y GRIFFITHS, H. 2004. The genes underlying tuber color in potato. In: XII International Plant and Animal Genome. January 10-14, 2004. San Diego, U.S.A. 351 p.
- DODDS, K. 1966. La evolución de la papa cultivada. Endeavour 25(95): 83-88.
- DOYLE, J. y DOYLE, J. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus 12: 13-15.
- ESTRADA, N. s.f. La biodiversidad en el mejoramiento genético de la papa. PROINPA/CID/CIP. Bolivia. pp: 25-33.
- FUESS, W. 1938. Die Geschichte der Kartoffel. Deutsche Zentralbucherei Aktiengesellschaft. Berlin. 96 p.
- GARCIA-MAS, J., GRACIANO, E., ARANZANA, M., MONFORTE, A., OLIVER, M.,

- BALLESTER, J., VIRUEL, M. y ARUS, P. 2000. Marcadores de ADN: Concepto, Tipos, Protocolos. In: Nuez, F. y Carrillo, J. (eds). Los Marcadores Genéticos en la Mejora Vegetal. Universidad Politécnica de Valencia, España. pp: 93-151.
- GHISLAIN, M., RODRIGUEZ, F., VILLAMON, F., NUÑEZ, J., WAUGH, R. y BONIERBALE, M. 2000. Establishment of microsatellite assays for potato genetic identification. Centro Internacional de la Papa Program Report (Perú). pp: 167-174.
- GHISLAIN, M., SPOONER, D., RODRIGUEZ, F., VILLAMON, F., NUÑEZ, J., VASQUEZ, C., WAUGH, R. y BONIERBALE, M. 2003. Selection of highly informative and user-friendly microsatellites (SSRs) for genotyping of cultivated potato. Theor. Appl. Genet. (On line). <<http://www.springerlink.com>> (15 feb. 2004).
- GLENDINNING, D. 1975. Chilean potatoes: an appraisal. Potato Res. 18: 306-307.
- GLENDINNING, D. 1978. Enriching the potato gene-pool using primitive cultivars. In: Zeven, A. y Van Harten, A. (eds). Proceeding of the conference Broadening the Genetic Base of Crops. Wageningen, Netherlands. pp: 42-46.
- GRATTAPAGLIA, D. y FERREIRA, M. 1996. Introducao ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 2ª ed. Brasilia. EMBRAPA. 220 p.
- GRUN, P. 1990. The Evolution of cultivated potatoes. Economic Botany. 44(Suppl.): 39-55.
- HAWCHUK, L., LYNCH, D., THOMAS, J., PENNER, B., SILLITO, D. y KULCSAR, F. 1996. Characterization of *Solanum tuberosum* Simple Sequence Repeats and application to potato cultivar identification. American Potato Journal 73(8): 325-335.
- HAWKES, J. 1956. Taxonomic studies on the tuber-bearing *Solanum*. I. *Solanum tuberosum* and the tetraploid species complex. London. Proc. Linn. Soc. 166: 97-144.
- HAWKES, J. 1972a. Evolutionary relationships in wild tuber-bearing *Solanum* species. Symp. Biol. Hung. 12: 65-69.
- HAWKES, J. 1972b. Evolution of the cultivated potato *Solanum tuberosum* L. Symp. Biol. Hung. 12: 183-188.
- HAWKES, J. 1990. Potato: Systematics and biodiversity. In: The potato evolution, biodiversity and genetic resources. Washington, U.S.A. Smithsonian Institution Press. pp: 62-67.
- HAWKES, J. 1994. Origins of cultivated potatoes and species relationships. In: Bradshaw, J. y Mackay, G. (eds). Potato Genetics. Wallingford, U.K. CAB International. pp: 3-39.
- HUAMAN, Z., ORTIZ, R. ZHANG, D. y RODRIGUEZ, F. 2000. Isozyme analysis of entire and Core Collections of *Solanum tuberosum* subsp. *andigena* potato cultivars. Crop Sci. 40: 273-276.
- HUAMAN, Z. y SPOONER, D. 2002. Reclassification of landrace populations of cultivated potatoes (*Solanum* SECT. Petota). American Journal of Botany 89(6): 947-965.
- JOPIA, J. 1997. Clasificación de clones de papa chilena (*Solanum tuberosum* L. ssp. *tuberosum* Hawkes) por electroforesis de proteínas. Tesis Lic. Agr. Valdivia. Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias. 61p.
- KRUGLYAK, S., DURRET, R., SCHUG, M. y AQUADRO, C. 1998. Equilibrium

- distributions of microsatellite repeat length resulting from a balance between slippage events and point mutations. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95(18): 10774-10778.
- MACIAS, M. 1986. Identificación de clones de papa chilena (*Solanum tuberosum* L.) por electroforesis de proteínas y esterasas. Tesis Lic. Agr. Valdivia. Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias. 49 p.
- MACIAS, M., MANCILLA, R. y CONTRERAS, A. 1989. Identificación de clones de papa chilena (*Solanum tuberosum* ssp. *tuberosum*) por electroforesis de proteínas y esterasas. *Agro Sur (Chile)* 17(1): 56-63.
- MATUS, I. y HAYES, P. 2002. Genetic diversity in three groups of barley germplasm assessed by simple sequence repeats. *Genome* 45(6): 1095-1106.
- MCGREGOR, C., LAMBERT, C., GREYLING, M., LOUW, J. Y WARNICH, L. 2000. A comparative assessment of DNA fingerprinting techniques (RAPD, ISSR, AFLP Y SSR) in tetraploid potato (*Solanum tuberosum* L.) germplasm. *Euphytica* 113: 135-144.
- MILBOURNE, D., MEYER, R., COLLINS, A., RAMSAY, L., GEBHARDT, C. y WAUGH, R. 1998. Isolation, characterization and mapping of simple sequence repeat loci in potato. *Mol. Gen. Genet.* 259: 233-245.
- MONTALDO, A. Y SANZ, C. 1962. Las especies de papas silvestres y cultivadas de Chile. *Agricultura Técnica (Chile)* 2: 66-152.
- NEI, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89: 583-590.
- NEI, M. 1987. *Molecular population genetic and evolution*. New York. Columbia University Press. 512 p.
- NSF POTATO GENOME PROJECT. 2004. Heterozygosity. <http://www.potatogenome.org/nsf3/potato_biology/heterozygosity.php> (04 may. 2004).
- PAREDES, M., BECERRA, B., MERA, M. y HINRICHSSEN, P. 1999. Marcadores moleculares en el mejoramiento de plantas. *Tierra Adentro (Chile)* 25: 26-28.
- PLAISTED, R. y HOOPES, R. 1989. The past record and future prospects for the use of exotic potato germplasm. *American Potato Journal* 66: 603-627.
- POWELL, W., MACHRAY, G. y PROVAN, J. 1996. Polymorphism revealed by simple sequence repeats. *Trends in plant science* 1(7): 215-222.
- PROVAN, J., POWELL, W., DEWAR, H., BRYAN, G., MACHRAY, G. y WAUGH, R. 1999. An extreme cytoplasmatic bottleneck in the modern European cultivated potato (*Solanum tuberosum*) is not reflected in decreased levels of nuclear diversity. *The Royal Society* 266: 633-639.
- RAKER, C. y SPOONER, D. 2002. Chilean tetraploid cultivated potato, *Solanum tuberosum*, is distinct from the Andean populations: microsatellite data. *Crop Scie.* 42: 1451-1458.
- SALAMAN, R. 1949. *The history and social influence of the potato. Revised impression*, Edited by J. G. Hawkes, 1985. Cambridge. Cambridge University Press. 685 p.
- SIEBENEICK, H. 1948. *Die deutschen und suslandisch Kartoffelsorten 1947/48*. Schriftenreihe für die Kartoffelwirtschaft. Heft 2 und 3.

-
- SIMMONDS, N. 1979. Potatoes. *In*: Simmonds, N. (ed). Evolution of crop plants. New York. pp: 279-283.
- SPOONER, D., CONTRERAS, A. y BAMBERG, J. 1991. Potato germplasm collecting expedition to Chile, 1989, and utility of the chilean species. *American Potato Journal* 68:681-690.
- STOLOVITZKI, G. y CECCHI, G. 1996. Efficiency of DNA replication in the polymerase chain reaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 93: 12947-12952.
- TAUTZ, D. y RENZ, M. 1984. Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. *Nucleic Acids Research* 12(10): 4127-4138.
- UGENT, D., DILLEHAY, T. y RAMIREZ, C. 1987. Potato remains from a late pleistocene settlement in southcentral Chile. *Economic Botany* 41(1): 17-27.
- VAZQUEZ, J., SANCHEZ-YELAMO, M. y CARRILLO, J. 2000. Marcadores morfológicos y bioquímicos. *In*: Nuez, F. y Carrillo, J. (eds). Los marcadores genéticos en la mejora vegetal. Universidad Politécnica de Valencia, España. pp: 25-89.
- WAGENINGEN UNIVERSITY. 2004. Potato Pedigree Database. (On line). Laboratory of Plant Breeding. <<http://www.dpw.wau.nl/pv/query.asp>> (21 may. 2004).
- ZAVALA, K. 2002. Desarrollo de un mapa de ligamiento genético en *Vitis vinifera* L., basado en marcadores moleculares SSR y AFLP. Tesis Lic. Bioquímica. Valdivia. Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias. 97 p.
- ZHANG, D., CARBAJULCA, D., OJEDA, L., ROSSEL, G., MILLA, S., HERRERA, C. y GHISLAIN, M. 2000. Microsatellite analysis of genetic diversity in sweetpotato varieties from Latin America. Centro Internacional de la Papa Program Report (Perú). pp: 299-301.

ANEXOS

Anexo 1. Variedades típicamente chilotas.

Código laboratorio	Código accesoión	Lugar de colecta	Características de los tubérculos
Chilo32	068-CCN-1041	Chilbé	Piel morosa, ovalada
Chilo35	073-CCN-1021	Chilbé	Piel blanca, ovalada
Chilo50	215-CCN-1075	Chilbé	Piel rosada, pulpa amarilla
Chilo52	254-CCN-902	Chilbé	Piel morosa, Piel de pulpa
Chilo53	260-CCN-917	Chilbé	Piel morosa, Piel crema con vitas moradas
Chilo56	275-CCN-758	Chilbé	Piel morosa, pulpa de color (fuera una negra) que la roja, alargada
Chilo60	204-CCN-4015	S.	Piel morosa, pulpa crema, ovalada
Chilo64	220-CCN-4090	S.	Piel morosa, pulpa crema, ovalada
Chilo66	242-CCN-4012	Chilbé	Piel con pigmentación morosa, pulpa crema, ovalada
Chilo73	386-CCN-488	Chilbé	Piel morosa pálida, pulpa blanca, ovalada
Chilo75	3814-CCN-4111	Chilbé	Piel morosa, pulpa crema, alargada
Chilo77	184-CCN-4117	Chilbé	Piel morosa, pulpa amarilla con algunas manchas
Chilo78	420-CCN-630	Chilbé	Piel morosa, pulpa amarilla con cinco
Chilo79	421-CCN-621	Chilbé	Piel blanca, pulpa crema, ojos profundos
Chilo80	422-CCN-1025	Chilbé	Piel blanca, alargada
Chilo81	428-CCN-628	Chilbé	Piel morosa, ovalada
Chilo86	457-CCN-1157	Isle de Gualtecas	Piel roja, pulpa de color
Chilo147	13-005	Chilbé	Piel morosa, pulpa color Letanaga
Chilo148	13-005	Chilbé	Piel morosa, pulpa color Letanaga
Chilo149	13-005	Chilbé	Piel morosa, pulpa amarilla con vitas moradas
Chilo118	13-011	Chilbé	Piel roja, pulpa de color, alargada (marchita en la)
Chilo215	002-JA-1170	S.	Piel pigmentada, pulpa amarilla
Chilo230	209-JA-100	Chilbé	Piel rosada, pulpa colorosa
Chilo253	167-JA-1591	Chilbé	Piel morosa, pulpa de color, alargada
Chilo255	163-JA-1118	S.	Piel morosa, pulpa de color, alargada
Chilo257	161-JA-1587	Chilbé	Piel morosa, pulpa de color
Chilo258	301-JA-1500	S.	Piel morosa, pulpa de color, ovalada
Chilo261	311-JA-1503	S.	Piel morosa, pulpa amarilla, ovalada
Chilo263	320-JA-1105	S.	Piel morosa pálida, pulpa blanca
Chilo264	322-JA-1221	S.	Piel morosa, pulpa crema, ovalada
Chilo270	373-JA-1587	Ayacu	Piel morosa, pulpa crema, ovalada
Chilo274	403-JA-1510	Chilbé	Piel morosa, pulpa crema
Chilo275	406-JA-1167	S.	Piel morosa, pulpa de color
Chilo276	411-JA-1006	S.	Piel morosa, pulpa amarilla
Chilo277	412-JA-1541A	S.	Piel morosa alargada, pulpa amarilla con manchas morosas
Chilo271	411-JA-1431	S.	Piel morosa, pulpa de color
Chilo2101	416-JA-1779	S.	Piel blanca, pulpa crema, alargada
Chilo205	409-JA-1039	S.	que la alargada
Chilo111	537-JA-1774	S.	Piel morosa, pulpa blanca
Chilo115	548-JA-1778	Chilbé	Piel blanca, pulpa crema, ojos profundos
Chilo113	553-JA-1157	S.	Piel morosa, pulpa crema

S.=sin información

Anexo 2. Accesiones de papas nativas del grupo colección.

Código laboratorio	Código accesoión	Lugar de colecta	Código laboratorio	Código accesoión	Lugar de colecta
Collec01	33-000-H-24-E-02	Dochrane	Collec144	233-000-N-10-13	Saltee
Collec02	33-000-H-24-E-03	Dochrane	Collec145	233-000-N-10-17	Saltee
Collec03	33-000-H-24-E-04	Dochrane	Collec146	233-000-N-10-24	Saltee
Collec04	33-000-H-24-E-05	Dochrane	Collec147	233-000-N-10-29	Saltea
Collec05	33-000-H-24-E-06	Dochrane	Collec148	233-000-N-10-31	Saltea
Collec06	33-000-H-24-E-07	Dochrane	Collec149	244-000-N-10-26	Saltee
Collec08	33-000-H-24-E-08	Dochrane	Collec151	244-000-N-10-27	Saltee
Collec09	33-000-H-24-E-13	Dochrane	Collec155	271-000-N-10-33	Saltea
Collec10	33-000-H-24-E-14	Dochrane	Collec157	283-000-N-10-22	Isla Kawadno
Collec11	33-000-H-24-E-15	Dochrane	Collec160	309-000-N-10-15	Saltea
Collec12	33-000-H-24-E-20	Dochrane	Collec165	309-000-N-10-14	Saltee
Collec14	774-000-1174	El Estero	Collec167	344-000-N-10-45	El Lago Largo
Collec17	775-000-1175	S.I.	Collec170	377-000-N-10-45	El Lago Largo
Collec18	777-000-1177	Saltee	Collec171	383-000-N-10-52	Saltee
Collec19	777-000-1177	Saltee	Collec174	383-000-N-10-57	Saltee
Collec20	775-000-1175	Saltea	Collec180	423-000-N-10-45	Saltea
Collec21	343-000-1133	Saltea	Collec185	453-000-N-10-11	Saltea
Collec22	343-000-1133	Saltee	Collec187	453-000-N-10-11	Saltee
Collec24	354-000-1134	Saltee	Collec188	474-000-N-10-55	Saltee
Collec26	357-000-1137	Saltee	Collec190	474-000-N-10-57	S.I.
Collec28	373-000-1137	Saltea	Collec191	475-000-N-10-55	S.I.
Collec30	373-000-1137	Saltea	Collec192	477-000-N-10-53	Saltea
Collec32	373-000-1137	Saltea	Collec193	477-000-N-10-57	Saltee
Collec33	373-000-1137	Saltea	Collec194	477-000-N-10-58	Saltee
Collec34	373-000-1137	Saltea	Collec195	478-000-N-10-75	Saltea
Collec35	353-000-1171	Saltea	Collec196	484-000-N-10-05	Saltea
Collec36	353-000-1171	Saltea	Collec198	505-000-N-10-01	Saltea
Collec37	331-000-1130	S.I.	Collec199	503-000-N-10-03	Saltee
Collec40	331-000-1134	Saltea	Collec100	500-000-N-10-03	Saltea
Collec41	332-000-1132	Saltea	Collec101	514-000-N-10-74	Saltee
Collec42	335-000-1135	S.I.	Collec102	517-000-N-10-55	Saltee
Collec43	335-000-1135	Saltee	Collec103	524-000-N-10-13	Saltee

(Continúa)

Continuación Anexo 2.

Colecc106	850-CC-4114	CHILE	Colecc175	86-189	CHILE
Colecc107	849-CC-4933	CHILE	Colecc174	86-188	CHILE
Colecc108	858-CC-4915	CHILE	Colecc173	86-186	CHILE
Colecc109	850-CC-4007	CHILE	Colecc172	86-187	CHILE
Colecc110	857-CC-4105	CHILE	Colecc177	86-189	CHILE
Colecc111	851-CC-4977	CHILE	Colecc176	86-190	CHILE
Colecc112	853-CC-4108	CHILE	Colecc175	86-188	CHILE
Colecc113	858-CC-4115	CHILE	Colecc177	86-189	CHILE
Colecc114	850-CC-4111	CHILE	Colecc178	86-190	CHILE
Colecc115	850-CC-4137	CHILE	Colecc179	86-191	CHILE
Colecc116	852-CC-4133	CHILE	Colecc180	86-192	CHILE
Colecc118	858-CC-4135	CHILE	Colecc181	86-193	CHILE
Colecc150	86-017	CHILE	Colecc176	86-190	CHILE
Colecc151	86-017	CHILE	Colecc177	86-191	CHILE
Colecc153	86-013	CHILE	Colecc188	86-198	CHILE
Colecc154	86-028	CHILE	Colecc189	86-199	CHILE
Colecc155	86-033	CHILE	Colecc190	86-200	CHILE
Colecc156	86-033	CHILE	Colecc191	86-201	CHILE
Colecc157	86-041	CHILE	Colecc192	86-202	CHILE
Colecc158	86-043	CHILE	Colecc193	86-203	CHILE
Colecc159	86-045	CHILE	Colecc194	86-204	CHILE
Colecc160	86-045	CHILE	Colecc195	86-205	CHILE
Colecc161	86-057	CHILE	Colecc196	86-206	CHILE
Colecc162	86-057	CHILE	Colecc197	86-207	CHILE
Colecc163	86-057	CHILE	Colecc198	86-208	CHILE
Colecc164	86-065	CHILE	Colecc199	86-209	CHILE
Colecc165	86-080	CHILE	Colecc200	86-210	CHILE
Colecc166	86-081	CHILE	Colecc201	86-211	CHILE
Colecc167	86-067	CHILE	Colecc202	86-212	CHILE
Colecc170	86-075	CHILE	Colecc203	86-213	CHILE
Colecc171	86-083	CHILE	Colecc204	86-214	CHILE
Colecc172	86-083	CHILE	Colecc205	86-215	CHILE

(Continúa)

Continuación Anexo 2.

Collec207	43-08-1007	Chirpa	Collec249	58-08-1014	SL
Collec208	43-08-1008	Chirpa	Collec251	243-08-1015	Chirpa
Collec209	71-08-1007	SL	Collec252	313-08-1016	Varadero, Colón
Collec210	74-08-1001	SL	Collec256	353-08-1017	SL
Collec212	74-08-1253	SL	Collec257	353-08-1017	Chirpa
Collec213	74-08-1005	Dehesa	Collec258	353-08-1017	SL
Collec214	74-08-1012	SL	Collec259	353-08-1124	SL
Collec216	75-08-1037	Casiquera	Collec260	473-08-0778	Chirpa
Collec217	75-08-1022	Arceñ	Collec261	482-08-077	SL
Collec218	75-08-1037	SL	Collec264	483-08-0778	Chirpa
Collec219	76-08-1295	SL	Collec267	483-08-1243	SL
Collec220	76-08-1173	SL	Collec268	484-08-1017	Chirpa
Collec221	76-08-1395	María	Collec269	484-08-1017	SL
Collec222	76-08-1507	San Blas	Collec269	473-08-1017	SL
Collec223	76-08-1501	Arceñ	Collec270	473-08-077	Challara
Collec224	76-08-1027	SL	Collec264	473-08-1017	SL
Collec225	76-08-1015	SL	Collec265	473-08-1017	SL
Collec226	76-08-1601	María	Collec266	487-08-1017	SL
Collec227	76-08-1512	SL	Collec267	483-08-1017	Chirpa
Collec228	76-08-1395	Chirpa	Collec268	50-08-1017	SL
Collec230	76-08-1023	SL	Collec269	512-08-1017	SL
Collec231	76-08-1015	SL	Collec270	513-08-1017	SL
Collec232	76-08-1015	Chirpa	Collec271	513-08-1017	San Blas
Collec233	76-08-1505	Arceñ	Collec274	52-08-0778	San Blas
Collec237	77-08-1015	SL	Collec275	522-08-077	SL
Collec238	77-08-1014	SL	Collec276	525-08-1017	SL
Collec239	77-08-1002	SL	Collec277	535-08-077	Chirpa
Collec240	77-08-1397	Chirpa	Collec278	541-08-1017	SL
Collec241	77-08-1713	Lago de Izapa	Collec279	547-08-1017	SL
Collec242	77-08-1504	SL	Collec280	557-08-077	María
Collec243	77-08-1127	SL	Collec281	573-08-077	SL
Collec245	77-08-1507	Arceñ	Collec282	573-08-077	SL
Collec246	77-08-1507	SL	Collec283	587-08-077	Chirpa
Collec248	77-08-1031	SL			

Anexo 3. Accesiones colectadas en el Archipiélago de los Chonos.

Código laboratorio	Código colección	Lugar de colección
Cronos015	006-CC-41144	Isla O'Higgins
Cronos059	307-CC-41127	Isla La Joya
Cronos062	315-CC-41127	Isla La Joya
Cronos083	317-CC-41138	Gaviotas
Cronos116II	147-CC-41125	Isla Infante
Cronos089	352-CC-41138	Gaviotas
Cronos072	364-CC-41121	Isla La Joya
Cronos101	523-CC-41139	Isla La Joya
Cronos212	411-JA-1641	SI
Cronos303	520-JA-1452	SI
Cronos324	528-JA-1648	Isla La Joya

S.I=sin información

Anexo 4. Variedades antiguas europeas.

Variedad	Año y país obtención	Cruzamiento (femenino x masculino)
May Queen	GB, 1830	desconocido
Jewel	Alemania, 1918	Victoria Augusta
Oberwälder (Oberwälder Blue)	Alemania, 1918	Plantula de Wilhelm Knorr
Reichs Kaiser	Alemania, 1896	Seed x Dober
Green Mountain	USA, 1885	Durmore x Excelstor
Wohlthmann (Herrschor Wohlthmann)	Alemania, 1835	Dacotica Erste von Fromdorf
Irish Cobbler ¹	USA, 1876 ¹	Plantula de Early Rose ¹ desconocido
Harbinger	CHI, 1914	Early Regent x Libasket
Early Rose	GB, 1867	Plantula de Garnet Chili
Early Vermont	USA, 1866	Jackson White x Vermont Chili
Charles Downing	USA, 1887	Early Rose x Excelstor
Flourball	GB, 1870 a 1895	desconocido
Rott	Alemania, 1872	desconocido
Fluke	GB, 1856	Pink Eye x Pink Eye
Abundance	GB, 1896	Magnum Bonum x plantula de Fox
Faterson Victoria ²	GB, 1856 ²	² Plantula de Fluke ² desconocido
President (Paul Kruger)	Inglaterra 1896	Empress x Wilhelm Knorr
Phylax Kidney	CHI, 1914	desconocido
Champion	CHI, 1916	Faterson Victoria x Faterson Victoria
International Kidney	GB, 1879	desconocido
White Rose ³	USA, 1871 ³ ; 1893 ³	Desconocido ³ Early Rose x White Star
Fortyfold	GB, 1896	desconocido
Institutional Heavens ⁴	Francia 1884	desconocido
Desree	Inglaterra 1962	Urgents x Depescha

Anexo 5. Distancias genéticas entre variedades chilotas, accesiones de los Chonos y variedades antiguas europeas.

(Continúa)

Continuación Anexo 5.

[illegible]

(Continúa)

Continuación Anexo 5.

Year	1990	1991	1992	1993	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020	2021	2022	2023	2024	2025	2026	2027	2028	2029	2030	2031	2032	2033	2034	2035	2036	2037	2038	2039	2040	2041	2042	2043	2044	2045	2046	2047	2048	2049	2050	2051	2052	2053	2054	2055	2056	2057	2058	2059	2060	2061	2062	2063	2064	2065	2066	2067	2068	2069	2070	2071	2072	2073	2074	2075	2076	2077	2078	2079	2080	2081	2082	2083	2084	2085	2086	2087	2088	2089	2090	2091	2092	2093	2094	2095	2096	2097	2098	2099	2100	2101	2102	2103	2104	2105	2106	2107	2108	2109	2110	2111	2112	2113	2114	2115	2116	2117	2118	2119	2120	2121	2122	2123	2124	2125	2126	2127	2128	2129	2130	2131	2132	2133	2134	2135	2136	2137	2138	2139	2140	2141	2142	2143	2144	2145	2146	2147	2148	2149	2150	2151	2152	2153	2154	2155	2156	2157	2158	2159	2160	2161	2162	2163	2164	2165	2166	2167	2168	2169	2170	2171	2172	2173	2174	2175	2176	2177	2178	2179	2180	2181	2182	2183	2184	2185	2186	2187	2188	2189	2190	2191	2192	2193	2194	2195	2196	2197	2198	2199	2200	2201	2202	2203	2204	2205	2206	2207	2208	2209	2210	2211	2212	2213	2214	2215	2216	2217	2218	2219	2220	2221	2222	2223	2224	2225	2226	2227	2228	2229	2230	2231	2232	2233	2234	2235	2236	2237	2238	2239	2240	2241	2242	2243	2244	2245	2246	2247	2248	2249	2250	2251	2252	2253	2254	2255	2256	2257	2258	2259	2260	2261	2262	2263	2264	2265	2266	2267	2268	2269	2270	2271	2272	2273	2274	2275	2276	2277	2278	2279	2280	2281	2282	2283	2284	2285	2286	2287	2288	2289	2290	2291	2292	2293	2294	2295	2296	2297	2298	2299	2300	2301	2302	2303	2304	2305	2306	2307	2308	2309	2310	2311	2312	2313	2314	2315	2316	2317	2318	2319	2320	2321	2322	2323	2324	2325	2326	2327	2328	2329	2330	2331	2332	2333	2334	2335	2336	2337	2338	2339	2340	2341	2342	2343	2344	2345	2346	2347	2348	2349	2350	2351	2352	2353	2354	2355	2356	2357	2358	2359	2360	2361	2362	2363	2364	2365	2366	2367	2368	2369	2370	2371	2372	2373	2374	2375	2376	2377	2378	2379	2380	2381	2382	2383	2384	2385	2386	2387	2388	2389	2390	2391	2392	2393	2394	2395	2396	2397	2398	2399	2400	2401	2402	2403	2404	2405	2406	2407	2408	2409	2410	2411	2412	2413	2414	2415	2416	2417	2418	2419	2420	2421	2422	2423	2424	2425	2426	2427	2428	2429	2430	2431	2432	2433	2434	2435	2436	2437	2438	2439	2440	2441	2442	2443	2444	2445	2446	2447	2448	2449	2450	2451	2452	2453	2454	2455	2456	2457	2458	2459	2460	2461	2462	2463	2464	2465	2466	2467	2468	2469	2470	2471	2472	2473	2474	2475	2476	2477	2478	2479	2480	2481	2482	2483	2484	2485	2486	2487	2488	2489	2490	2491	2492	2493	2494	2495	2496	2497	2498	2499	2500
------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------

Anexo 6. Distancias genéticas entre variedades típicamente chilotas.

[illegible]

(Continúa)

Continuación Anexo 6.

	016	0101	0103	0105	0107	0108	0109	0110	0114	0116	0121	0122	0123	0125	0126	0127	0128	0129	0130	0131	0132	0133
0205	---																					
0209	0.02	---																				
0103	0.01	0.01	---																			
0105	0.01	0.01	0.01	---																		
0107	0.02	0.01	0.01	0.02	---																	
0209	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	---																
0201	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.01	---															
0103	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	---														
0201	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	---													
0209	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	---												
0201	0.02	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	---											
0103	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	---										
0107	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	---									
0209	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	---								
0201	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	---							
0103	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	---						
0107	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	---					
0209	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	---				
0201	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	---			
0103	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	---		
0107	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	---	
0209	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	---

Anexo 7. Distancias genéticas entre accesiones silvestres de papas colectadas en el Archipiélago de los Chonos.

	010001	010002	010003	010004	010005	010006	010007	010008	010009	010010	010011	010012
010001	---											
010002	0.001	---										
010003	0.001	0.002	---									
010004	0.002	0.002	0.002	---								
010005	0.002	0.002	0.002	0.002	---							
010006	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	---						
010007	0.001	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	---					
010008	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	---				
010009	0.001	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	---			
010010	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	---		
010011	0.001	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	---	
010012	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	---

Anexo 8. Distancias genéticas entre 23 variedades antiguas europeas.

M.Q.=May Queen; **Jub.**=Jubel; **Oden.**=Odenwälder; **Rch.**=Reichskanzler; **G.M.**=Green Mountain; **Wht.**=Wohltmann; **I.C.**=Irish Cobbler; **Harb.**=Harbinger; **E.R.**=Early Rose; **E.V.**=Early Vermont; **Ch.D.**=Charles Downing; **Fl.**=Flourball; **Flk.**=Fluke; **Ab.**=Abundance; **P.V.**=Paterson Victoria; **Pt.**= President; **R.K.**=Royal Kidney; **Ch.**=Champion; **I.K.**=International Kidney; **W.R.**=White Rose; **Fort.**=Fortyfol; **I.B.**=Institut de Beauvais

Evaluación de la diversidad genética de papas nativas (*Solanum tuberosum* L.ssp. *tuberosum* Hawkes) silvestres y cultivadas del sur de Chile, mediante el uso de marcadores microsatélites

[illegible]