

UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
ESCUELA DE AGRONOMIA

Determinación de tipos citoplasmáticos y diversidad genética a nivel nuclear de la papa nativa chilena y cultivares europeos (*Solanum tuberosum* ssp. *tuberosum*)

Tesis presentada como parte de los requisitos para optar al grado de Licenciado en Agronomía

Pamela Beatriz Grau Núñez
Valdivia – Chile
2007

Profesor Patrocinante: RICARDO RIEGEL S.
Ing. Agr, M.Sc., Dr. Rer. Silv. _____

Profesores informantes:

ANDRES CONTRERAS M.
Ing. Agr. _____

NANCY ANDRADE S.
Ing. Agr., M.Sc. _____

INSTITUTO DE PRODUCCION Y SANIDAD VEGETAL

AGRADECIMIENTOS

Primero, quiero agradecer a mi mamá, por haber estado siempre conmigo, apoyándome en todo momento, y por todos los sacrificios que tuvo que realizar para que yo, y mis hermanos pudiéramos estudiar. Mamita, te quiero mucho mucho, GRACIAS!!

A mi hermano Lucho, por haber sido siempre como un segundo papá, siempre a mi lado y al de mis hermanos. Jorge, gracias por tu constante apoyo, y por ayudarme cada vez que te lo pedí, aunque estuvieras muy cansado, y Ale, gracias por haberme "aguantado" todos estos años.

A mis amigas de siempre gracias por haberme acompañado incondicionalmente, desde que éramos muy chicas hasta el día de hoy. A la Dany, Luchin y Pablo, ustedes saben que siempre fueron los amigos con quienes pude contar durante todos los años que estuvimos juntos en la U.

A mi profesor patrocinante, Ricardo Riegel, gracias por haberme apoyado y esperado todo este tiempo, y por tener la mejor disposición y buena voluntad ante cualquier duda o problema. También quiero agradecer a mi profesor Andrés Contreras, el que me ayudó, acompañó, y con quien nos divertimos en todo momento hasta la finalización de esta tesis.

Por último quiero agradecer a Jaime, que aunque llegó casi al término de mi camino por la Universidad, fue un gran y constante apoyo, al que le agradezco todo su amor y comprensión en esta última etapa ya finalizada.

Dedicada a mi mamá, Mariví, y a mi Omi, a la que yo sé, le hubiera encantado estar aquí en estos momentos.

INDICE DE MATERIAS

Capítulo		Página
1	INTRODUCCION	1
2	REVISION BIBLIOGRAFICA	3
2.1	Antecedentes generales de la papa	3
2.1.1	Origen y evolución de <i>S. tuberosum</i>	5
2.1.2	Banco de Germoplasma Chileno de Papas de la UACH	8
2.2	ADN citoplasmático (citotipos)	11
2.3	Marcadores moleculares	14
2.3.1	Amplificación específica de secuencias de ADN (STS)	16
2.3.2	Marcadores genotípicos del citoplasma en papa	18
3	MATERIALES Y MÉTODOS	21
3.1	Material vegetal	21
3.2	Equipos y material de laboratorio	21
3.3	Amplificación específica de ADN de los citotipos mediante la reacción PCR	22
3.4	Visualización y evaluación de fragmentos de ADN	24
3.5	Análisis de datos	25
4	PRESENTACION DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN	27
4.1	Tipos citoplasmáticos presentes en el Banco de Germoplasma de la Papa de la UACH	27

Capítulo		Página
4.2	Frecuencia de los citotipos	32
4.3	Análisis de diversidad	34
4.4	Distancia genética	39
4.4.1	Distancia genética entre grupos que presentan un mismo citotipo.	39
4.4.2	Distancia genética entre individuos.	41
5	CONCLUSIONES	47
6	RESUMEN	49
7	SUMMARY	51
8	BIBLIOGRAFÍA	53

INDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Ubicación taxonómica de las papas cultivadas y silvestres	4
2	Series presentes en Chile, pertenecientes a la sección <i>Petota</i> , y sus respectivas especies	10
3	Distintos marcadores genéticos y sus características	16
4	Partidores utilizados para la reacción PCR	23
5	Accesiones nativas de Chile analizadas, y su tipo citoplasmático correspondiente	29
6	Nombre comercial y el tipo de citoplasma obtenido para cada accesión europea analizada	32
7	Datos de diversidad y heterocigocidad calculados para cada grupo citoplasmático encontrado	35
8	Distancias genéticas entre cada citotipo, obtenidas mediante el programa pop gene versión 3.2	39

INDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Posible evolución de las papas cultivadas y sus niveles de ploidía	6
2	Áreas de distribución de las series y especies de papa en Chile	9
3	Esquema de la Reacción de la Polimerasa en Cadena (PCR)	18
4	Visualización en un gel de agarosa de los tipos de ADN del cloroplasto y de la mitocondria	28 33
5	Frecuencia encontrada para los distintos citotipos	36
6	Diversidad v/s frecuencia	
7	Dendrograma obtenido en base a las distancias genéticas (NEI, 1987) entre grupos T/ β , W/ β , T/ α , W/ α mediante la variación alélica de SSRs del núcleo	40
8	Diagrama de coordenadas principales basado en las distancias genéticas existentes entre los individuos analizados	42
9	Dendrograma de las accesiones de papas con el citotipo T/ β , obtenido en base a las distancias genéticas (NEI, 1978) mediante la variación alélica de SSRs del núcleo	43
10	Dendrograma de las accesiones de papas de los citotipos W/ β , T/ α , W/ α , y la porción mas representativa de las accesiones T/ β , obtenido en base a las distancias genéticas (NEI, 1978) mediante la variación alélica de SSRs del núcleo	44

INDICE DE ANEXOS

Anexos		Página
1	Accesiones nativas. Con sus respectivos códigos de accesión, y de laboratorio, además de su lugar de colecta	62
2	Códigos de laboratorio de cada cultivar europeo, y el año de su creación	67

1 INTRODUCCIÓN

El sur de Chile, especialmente la Isla de Chiloé, es considerado un subcentro de origen de la papa cultivada *Solanum tuberosum* ssp. *tuberosum* Hawkes.

Por esta razón es que diversos investigadores, principalmente de la Universidad Austral de Chile (UACH), se han preocupado en coleccionar, clasificar y conservar accesiones locales de esta especie. Así se llegó a formar el Banco de Germoplasma de la Universidad Austral de Chile, el que es considerado como el más grande del país, en cuanto a papa se refiere.

Existen variadas teorías en torno a si es que el Sur de Chile es realmente un subcentro de origen, y de ser así como es que se originó esta papa cultivada, que especie sería su ancestro, como esta papa nativa llegó a Europa, y que relación de parentesco existiría entre estos cultivares. Los marcadores moleculares son una alternativa para tratar de comprobar esta situación, esto mediante el estudio del material genético que las papas nativas chilenas y europeas presentan.

El ADN citoplasmático, es una herramienta útil para poder determinar las relaciones filogenéticas que pudieran existir entre las especies, esto por que este ADN es de herencia uniparental. En el caso de la papa es de herencia exclusivamente materna, lo que confiere una alta conservación de este ADN durante el tiempo.

Los marcadores moleculares PCR específicos, permiten identificar los distintos tipos de ADN citoplasmáticos, este tipo de marcador se destaca por su simple utilización, y por la rapidez de estos para hacer los análisis.

La hipótesis de esta tesis es que en las papas nativas de Chile *S. tuberosum ssp tuberosum*, existen distintos tipo citoplasmáticos, y que estos tipos a su vez son compartidos con las papas antiguas europeas, y además con, *S. tuberosum ssp andígena*.

El objetivo general es determinar los distintos tipos citoplasmáticos presentes en la colección de papa nativa y cultivares europeos.

Los objetivos específicos son determinar los tipos citoplasmáticos y su frecuencia, relacionarlos con la información genética del núcleo, determinar las relaciones genéticas que existen entre los grupos que presentan los distintos tipos citoplasmáticos y entre los individuos.

2 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Antecedentes generales de la papa.

La papa es una especie que pertenece al género *Solanum*. Dentro de éste género es posible encontrar varios subgéneros. La papa se encuentra ubicada dentro del subgénero *Potatoe* (G.Don) D`Arcy. El subgénero *Potatoe* a su vez es dividido en secciones, y es en la sección *Petota* en donde se encuentran incluidas las especies formadoras de tubérculos. Además, las secciones son divididas en series. Dentro de las especies formadoras de tubérculos, es posible encontrar 19 diferentes series (HAWKES, 1990). Dentro de estas 19 series se encuentra la serie *Tuberosa*, que es en la cual se encuentra ubicada la especie cultivada tetraploide *Solanum tuberosum*. Dentro de esta serie, también se pueden encontrar otras especies diploides tanto silvestres como cultivadas (BUKASOV 1933; GRUN, 1990; HAWKES1990). La papa cultivada pertenece a la familia *Solanaceae*, a la cual pertenecen más de 2000 especies distintas, y es pariente del tomate, ají, pimentón, berenjena, y tabaco, entre otras (HAWKES, 1990; ESTRADA, 2000; BUKASOV, 1933).

En el Cuadro 1, se puede observar la clasificación taxonómica en que se encuentra la papa.

CUADRO 1 Ubicación taxonómica de las papas cultivadas y silvestres.

Clasificación taxonómica	
División	Spermatophyta
Subdivisión	Angiospermae
Clase	Dicotyledoneae
Orden	Solanales, Tubiflorales
Suborden	Solaninales
Familia	Solanaceae
Subfamilia	Solanoideae
Tribu	Solanae
Subtribu	Solaninae
Género	Solanum
Subgénero	Potatoe
Sección	Petota
Subsección	Potatoe
Series	19 series

FUENTE: CONTRERAS (1999) modificado de D`arcy

Las especies de papas se encuentran distribuídas desde el estado de Colorado y Utah en Estados Unidos hasta la Isla de Chiloé al sur de Chile, desde el nivel del mar hasta por sobre los 4500 m.s.n.m (HAWKES, 1972a).

GAY (1831), BUKASOV (1933), O'COMPLEY (1937), KELLER (1952), MONTALDO Y SANZ (1962), HAWKES (1990), señalan que la ssp. *tuberosum*, es nativa de la Isla de Chiloé, y del Archipiélago de los Chonos, y que la ssp. *andígena* es nativa de Sudamérica andina, y parte de Venezuela hasta el norte de Chile y Argentina.

Actualmente se reconocen 235 especies de papa, de las cuales 228 son especies silvestres, y las siete restantes, son cultivadas (LUJAN, 2001). Dentro de estas siete especies se incluyen a las especies diploides: *S. ajanhuiri*, *S. phureja* y *S. stenotomum*; triploides: *S. chaucha* y *S. juzepczukii*; tetraploide: *S. tuberosum* y pentaploide: *S. curtilobum* (OCHOA, 1972; HAWKES, 1990; HUAMAN y SPOONER, 2002).

Dentro de la especie *S. tuberosum* ($2n = 4X = 48$), están incluidos todos los cultivares tetraploides, distinguiéndose especialmente a la subespecie *andígena* y a la subespecie *tuberosum* (HAWKES, 1972b; HAWKES, 1990). Según ESTRADA (2000) estas especies tetraploides se habrían originado por la fusión de gametos $2n$ del complejo *S. stenotomum* con una especie silvestre no identificada.

2.1.1 Origen y evolución de *S. tuberosum*. Según Bukasov (1966; 1970) citado por PEREZ (2004), el origen de la papa (*S. tuberosum*) se encuentra en Sudamérica, más específicamente, se originó alrededor del lago Titicaca en Perú. Además, se considerada como subcentro de origen a la zona sur de Chile, específicamente a la Isla Grande de Chiloé (BUKASOV, 1933; GRUN, 1990).

ESTRADA (2000), señala que las primeras papas domesticadas pertenecieron a la especie *S. stenotomum*, las que al cruzarse con una especie silvestre diploide aún no identificada, produjeron a la especie *S. andígena*,

especie que es considerada como la precursora de la actuales *S. tuberosum* ssp. *andígena*, y *S. tuberosum* ssp. *tuberosum* (FIGURA 1).

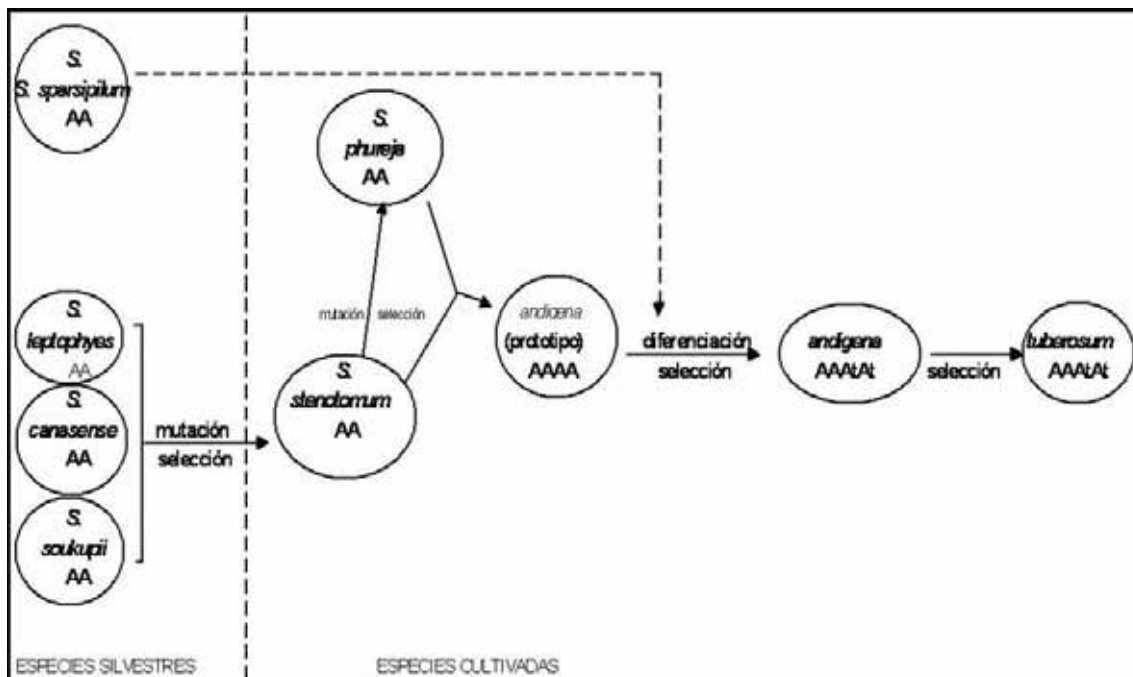


FIGURA 1 Posible evolución de las papas cultivadas y sus niveles de ploidía.

FUENTE: CONTRERAS (2001) modificado de Hawkes (1967), Matsubayashi (1991).

La especie cultivada y que a su vez es la de mayor uso alrededor del mundo, corresponde a *S. tuberosum* ssp. *tuberosum*, la cual habría evolucionado, en forma paralela en el sur de Chile y en Europa por selección y adaptación a días largos, de la ssp. *andígena* (HAWKES, 1990). MATSUBAYASHI (1991) sugiere que la ssp. *andígena* se originó a partir de dos especies diploides cultivadas *S. phureja* y *S. stenotomum*.

Para reforzar lo anterior, 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* si fue derivada de la cruce de *S. stenotomum* y una especie diploide.

Bukasov (1933, 1966, 1968), citado por CONTRERAS (1984) señala la hipótesis de que la ssp. *tuberosum* se originó en Chiloé a partir de las especies *S. leptostigma* y *S. molinae*. Se piensa que de esta forma la especie chilena habría sido llevada a Europa, para posteriormente participar en la formación de la antigua papa cultivada en el viejo mundo. Cabe mencionar que de hecho las especies *S. leptostigma* y *S. molinae*, poseen el tipo característico de ADN del cloroplasto que posee la ssp. *tuberosum*.

En contraste a esta teoría, Hawkes (1956) y Salaman (1937,1946), citados por HOSAKA Y HANNEMAN (1988 a), proponen una idea diferente, ya que ellos investigaron antiguas descripciones, dibujos y herbarios que se mantenían en Europa desde la primera introducción de papa al continente, e indican que el cambio morfológico se produjo en forma gradual desde la ssp. *andígena* a la ssp. *tuberosum*. Esto combinado con otros expedientes, les permitieron llegar a la conclusión de que la ssp. *andígena* fue introducida en Europa, y solo entonces se transformó en ssp. *tuberosum*.

Está reconocido que el *pool* (combinación) genético básico de las papas europeas está compuesto por genes de papa chilota-chilena (*Solanum tuberosum* spp. *tuberosum*) y papa andina (*S. tuberosum* spp. *andígena*) proveniente de Perú y Bolivia BUKASOV (1933), FUESS (1938), SIEBENEIK (1948), HOUGAS Y ROSS (1956), SYKIN (1971), ROSS (1986) Y PLAISTED Y HOOPES (1989)..

Al respecto, CONTRERAS (1984) cita a historiadores como Salaman, (1949) , el que señala que Drake recibió papas el año 1578, de los naturales de Isla Mocha, Cavendish las encontró en la Isla Santa María (Concepción) el año 1587; Gay (1831) menciona la “Cordillera de los Poñis” indicando que esta papa era natural del país y que los mapuches la consumían; Fuess (1938), menciona que el antiguo grupo de cultivares inglés-norteamericano tendría su origen en material chileno llevado desde Chile a Inglaterra en el año 1586 por vía Cartagena.

2.1.2 Banco de Germoplasma Chileno de Papas de la UACH. Actualmente, la colección del banco de germoplasma de la UACH es la más importante del país y del mundo, en relación a accesiones del Sur de Chile de *S. tuberosum* ssp. *tuberosum*. Además, dentro de la colección es posible encontrar otras especies que también pertenecen al genero *Solanum* (MONTALDO y SANZ, 1962; CONTRERAS, 1992; DE VICENZI, 2006).

En Chile hay reconocidas cinco series pertenecientes a la Sección Petota, las que se pueden observar en la Figura 2.

En el Cuadro 2 se presentan las series existentes en Chile, con sus respectivas especies. Cabe mencionar que según BUKASOV (1933); HAWKES (1990) y SPOONER *et. al.*, (1991), las especies *S. etuberosum*, *S. fernandezianum*, *S. palustre*, *S. sitiens*, y *S. tuberosum* ssp. *tuberosum* son consideradas especies endémicas de Chile.

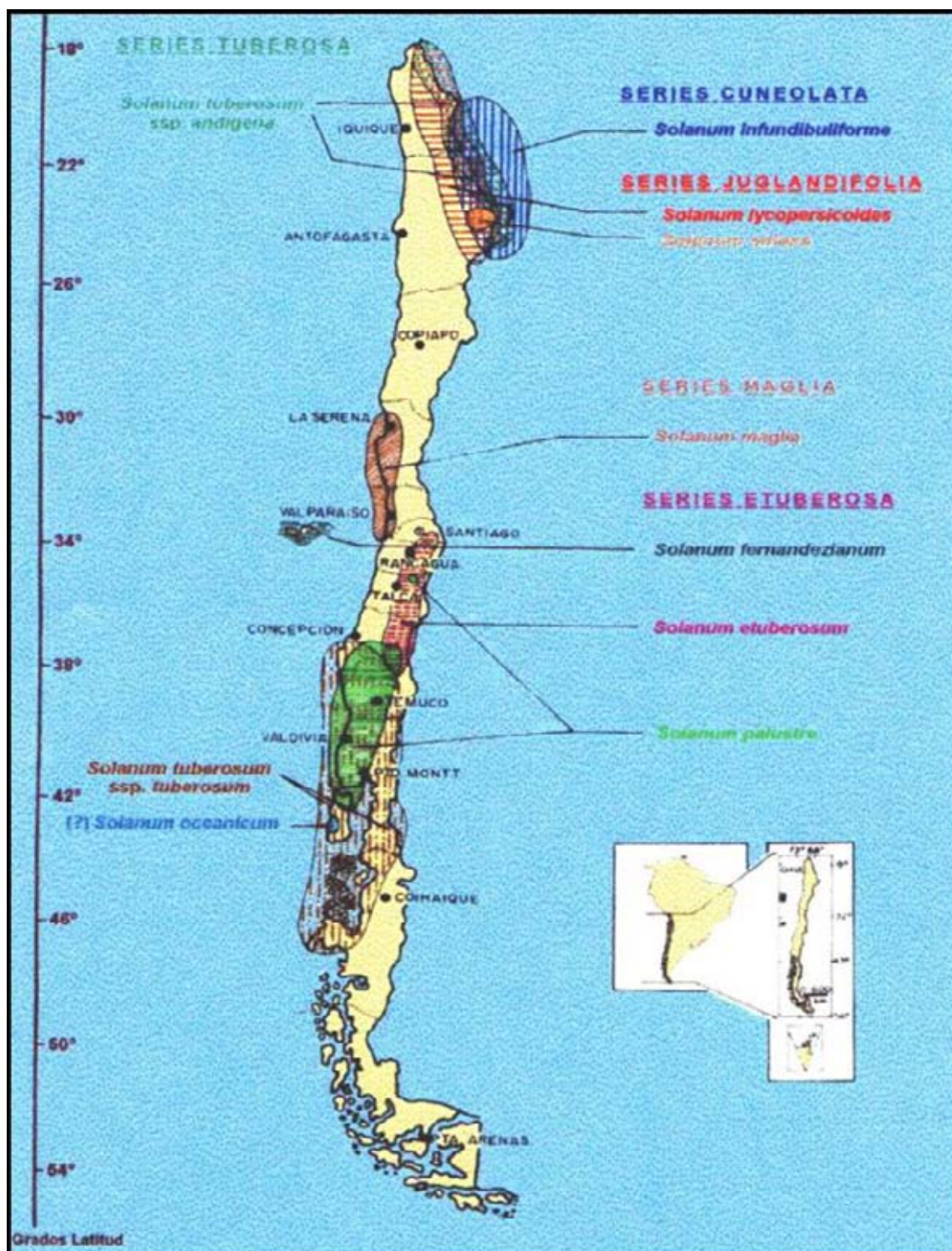


FIGURA 2 Áreas de distribución de las series y especies de papa en Chile.

FUENTE: CONTRERAS (1999)

CUADRO 2 Series presentes en Chile, pertenecientes a la sección *Petota*, y sus respectivas especies.

Serie (ploidía)	Especies
<i>Cuneolata</i> (2x)	<i>S. infundibuliforme</i>
<i>Etuberosa</i> (2x)	<i>S. etuberosum</i> , <i>S. fernandezianum</i> , <i>S. palustre</i>
<i>Juglandifolia</i> (2x)	<i>S. lycopersicoides</i> , <i>S. sitiens</i>
<i>Maglia</i> (3x)	<i>S. maglia</i>
<i>Tuberosa</i> (4x)	<i>S. tuberosum</i> ssp. <i>tuberosum</i> , <i>S. tuberosum</i> ssp. <i>andígena</i>

FUENTE: Adaptado de CONTRERAS (2000)

En el año 1956, profesionales independientes, constituyeron una colección de especies pertenecientes al género *Solanum* para la Estación Experimental Centinela del Ministerio de Agricultura ubicada en Puerto Octay (CONTRERAS, 1987). Una parte de esta colección, fue trasladada a la UACH, y se comenzó con el banco de germoplasma de esta especie en esta Universidad. Es en el año 1969, que se dio inicio a la búsqueda y recolección sistemática de todo el material que hoy pertenece al Banco de Germoplasma que actualmente existe (CONTRERAS *et al*, 1979)

La colección de papas que se mantiene actualmente en la Universidad Austral de Chile, fue producto de múltiples expediciones al sur de Chile, en la Isla Grande de Chiloé, y el Archipiélago de los Chonos. Dicho material llegó a constituir un número superior a las 750 accesiones. Debido a que el agricultor chilote da muchos nombres distintos para una misma variedad, y/o a distintas variedades le da un mismo nombre, se hizo urgente la necesidad de identificar

sinonimias. Así Contreras (1969) realizó un pionero trabajo sobre este material clasificándolo según sus características anatomorfológicas. Posteriormente MACIAS *et al* (1989) y CONTRERAS y MANCILLA (1989) usando la técnica de electroforésis en geles de poliacrilamida disminuyeron la colección a 296 accesos. PEREZ (2004) vía marcadores moleculares demostró la existencia de solo algunas accesiones repetidas.

Esta colección hoy en día es mantenida en forma vegetativa, es decir, tubérculos, esquejes, y cultivos *in vitro*, y de forma generativa, es decir, por medio de semillas, esto se realiza principalmente en el Centro Experimental Santa Rosa perteneciente a la UACH (CONTRERAS, 1999).

2.2 ADN citoplasmático (citotipos).

El ADN citoplasmático, se encuentra presente en cloroplastos y mitocondrias, y este se caracteriza por la naturaleza uniparental de su herencia. En angiospermas se produce exclusivamente por vía materna, a diferencia de las gimnospermas, en las que el ADN del cloroplasto es heredado vía paterna (RUSSELL, 2002). Existe el caso excepcional de algunas angiospermas en las cuales la herencia es biparental (ZHANG *et al.*, 2003).

En papas se han encontrado distintos tipos de ADN del cloroplasto (también conocidos como haplotipos), los cuales se han denominado T, W, C, S y A. Se han encontrado similares frecuencias entre algunos de estos citotipos, pudiendose observar entre las papas cultivadas y las especies nativas ancestrales (SUKHOTU *et al.*, 2004).

Para el caso del ADN mitocondrial, se han descrito cinco tipos de ADN denominados α , β , γ , δ , y ϵ (LÖSSL *et. al.*, 1999).

La combinación de el tipo de ADN del cloroplasto con el tipo de ADN mitocondrial, es lo que se denomina tipo citoplasmático o citotipo.

El tipo citoplasmático T/ β , es aquel que poseen la mayoría de las variedades de papa cultivada alrededor del mundo. Se ha demostrado que ésta tiene un único ADN del cloroplasto tipo T, y de la mitocondria tipo β , el cual deriva de la papa chilena (*S. tuberosum ssp. tuberosum*) (HOSAKA, 2003).

También está claro que este citotipo no se encuentra en especies silvestres, salvo por algunas excepciones (HOSAKA, 1995).

El Tipo citoplasmático W/ α , es el citotipo común entre las especies silvestres presentes en América del sur. Dentro de estas especies se encuentra la *ssp. andígena*, la que aparentemente se habría desarrollado al producirse una introgresión en estas papas silvestres (HOSAKA, 1995). Para el caso de este estudio se utilizará este citotipo para referirse a las especies típicamente andígenas.

Los cambios sufridos por la papa típica *andígena* para su posterior adaptación a las nuevas condiciones de día largo fueron tanto de tipo fisiológico como de tipo morfológico. Los principales cambios fueron, madurez más temprana, reducción del número de brotes secundarios y de la disección foliar, disminución del número y tamaño de los estolones, y menos tubérculos, pero de mayor tamaño (ESTRADA, 2000).

Desde el punto de vista molecular, está comprobado que el ADN del cloroplasto tipo T derivó del ADN tipo W a través de la supresión de un fragmento en su genoma. El largo de este fragmento es de 241 pares de bases (KAWAGOE y KIKUTA, 1991), y su delección habría ocurrido en especies silvestres diploides, las que posteriormente se desarrollaron como especies tetraploides (HOSAKA, 1995).

Algunas poblaciones de *S. tarijense* también poseen este ADN del cloroplasto tipo T y HOSAKA (2003), señala los posibles eventos que pudieran haber ocurrido, para que esta especie y la papa chilena compartan este tipo de ADN:

- *S. tarijense*, fue domesticada en forma independiente en Bolivia, transformándose en *S. stenotomum*.
- *S. tarijense*, fue naturalmente hibridizada con *S. stenotomum*, convirtiéndose así en una de las especies locales de Bolivia.
- *S. tarijense* se hibridizó naturalmente con *S. tuberosum* ssp. *andígena* en el proceso de migración hacia Chile. Esta es la teoría propuesta por GRUN (1990).

Para corroborar alguno de estos eventos, HOSAKA (2004) realizó otro trabajo en el cual pudo determinar que el ADN del cloroplasto tipo T y mitocondrial tipo β , si fueron introducidos a partir de algunas poblaciones de *S. tarijense*. Esta especie al cruzarse como el progenitor femenino con *S. tuberosum* ssp. *andígena*, habría producido un híbrido natural. Esto hecho es factible, ya que el área de distribución de ambas es común en el norte de Argentina (sobre los 2.200 m.s.n.m.). Posteriormente, y por medio de selección natural se llegó a la obtención de la papa chilena cultivada (*S. tuberosum* ssp. *tuberosum*).

En la especie *S. tuberosum* ssp. *tuberosum* se han encontrado al menos siete factores de esterilidad citoplasmática, y es interesante que *S. tuberosum* ssp. *andígena* no presente estos factores de esterilidad (HOSAKA *et. al.*, 1988). Se piensa que es menos probable que esta esterilidad citoplasmática sea inducida por el ADN del cloroplasto, sino que esta podría estar asociada con el ADN mitocondrial como es el caso de otros cultivos que también la presentan (CARDI *et al.*, 1999). Sin embargo, DE VICENZI (2006), al analizar los factores

de esterilidad citoplasmática, encontró diferencias significativas entre los tipos de citoplasmas, demostrando que el citotipo T/ β se encuentra asociado a los factores de esterilidad, no así el tipo citoplasmático W/ α , el que está asociado a características de fertilidad.

Según LÖSSL *et al* (2000) el citoplasma denominado como W, es el más antiguo y del cual evolucionaron los demás citotipos, razón por la cual no deberían existir problemas de esterilidad para éste. Por otra parte, serían los cultivares con el citoplasma tipo T los que presentan una producción mayor de los tubérculos (GLENDDINNING, 1983 Y PROVAN *et al.*, 1999).

La característica de esterilidad citoplasmática presentada por *S. tuberosum* ssp. *tuberosum*, también la posee *S. tarijense*, lo que reafirma los resultados obtenidos por HOSAKA (2004), que indican que esta especie es el ancestro materno de la ssp. *tuberosum*.

Sin embargo, SPOONER *et al* (2005) basados en estudios de RFLP, aplicado a cultivares silvestres y cultivados de papas, indican que el ancestro materno de la ssp. *tuberosum* sería *S. brevicaulis* complex, y no *S. tarijense* como se indica anteriormente.

2.3 Marcadores moleculares.

Históricamente la caracterización del germoplasma se ha hecho a través del análisis de las características fenotípicas de las especies, lo cual tiene como limitante la influencia ambiental sobre las características de cada especie además del tiempo requerido para la colección de los datos (BECERRA y PAREDES, 2000).

Así es, entonces, que las mejoras genéticas eran posible de llevar a cabo debido solo a la variabilidad genética, a la heredabilidad del carácter que se quería aislar, y a la eficacia e intensidad de la selección aplicada (CLAROS, 2004).

Es por estas y por muchas otras razones que se llevó a cabo el desarrollo de los marcadores moleculares, los que a pesar de tener diferentes bases moleculares tienen la misma concepción de determinar la organización de la estructura genética en poblaciones naturales y cultivadas, además de demostrar la similitud entre y dentro de las poblaciones evitando el efecto ambiental (BECERRA y PAREDES, 2000).

El número de técnicas utilizadas con los marcadores genotípicos es cada vez mayor, dentro de las cuales se pueden nombrar las siguientes:

- Fragmentos de Restricción Polimórficos (RFLP).
- Fragmentos polimórficos de ADN Amplificados al Azar (RAPD).
- Fragmentos Polimórficos de ADN Amplificados (AFLP).
- Microsatélites (SSR).

Las características de los marcadores moleculares señalados anteriormente se pueden observar en el Cuadro 3.

Muchas de estas técnicas se basan en la técnica PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa). Mediante esta reacción es posible realizar una amplificación *in vitro* de una secuencia específica de ADN (CAMPOS, 1995).

Para la realización de la técnica PCR, es necesario el uso de un termociclador (el que realiza los cambios de temperatura necesarios para producir la amplificación del ADN), además de este aparato, es necesario, una

batería de enzimas, partidores y el ADN que se desea amplificar, entre otros reactivos. En condiciones normales ocurren amplificaciones sin problemas de fragmentos de hasta 6 kpb de longitud (CLAROS, 2004).

CUADRO 3. Distintos marcadores genéticos y sus características

Característica	RFLP	RAPD	AFLP	SSR	STS
Polimorfismo	Bajo - alto	Medio - alto	Medio – alto	Alto	Medio - bajo
Estabilidad Ambiental	Alta	Alta	Alta	Alta	Alta
Número de <i>loci</i>	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto
Reproducibilidad	Alta	Moderada - alta	Alta	Alta	Alta
Aplicación	Lenta - cara	Rápida - cara	Lenta – cara	Lenta - cara	Rápida - cara

RFLP : Fragmentos de restricción polimórficos

RAPD : Amplificación de ADN al azar

AFLP : Amplificación de fragmentos polimórficos

SSR : Secuencias simples repetidas

STS : Marcadores PCR específicos

FUENTE: Modificado de BECERRA Y PAREDES (2000)

2.3.1 Amplificación específica de secuencias de ADN (STS). La técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), fue desarrollada como un método para la amplificación de las secuencias específicas de ADN, por Mulis y Faloona en el año 1987. Un ciclo PCR consta de 3 etapas:

- La primera etapa, es la etapa de denaturación, y es aquella en la que por medio del aumento de la temperatura a aproximadamente 95°C, se separan las 2 hebras de la molécula de ADN (hebras moldes) para su posterior amplificación.
- La segunda etapa, denominada de acoplamiento o “annealing” consiste en una reducción de la temperatura a 35-60°C. Con esta reducción se permite que los partidores se hibriden con las secuencias complementarias del ADN.
- En la tercera y última 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, debido al aumento de la temperatura a 72°C, temperatura óptima para el funcionamiento de la ADN polimerasa de *Thermus aquaticus* (Taq). Esta enzima permite la unión de los nucleótidos complementarios (nueva hebra de ADN) a la hebra molde (STOLOVITZKI y CECCHI, 1996)

En la Figura 3, se encuentran estas tres etapas esquematizadas para un mejor entendimiento de la reacción PCR.

LÖSSL *et al.* (2000) señalan que los partidores PCR específicos, son aquellos que reconocen un fragmento determinado en la secuencia de ADN, que es aquel que se desea amplificar. Con la utilización de esta técnica es fácil poder diferenciar los distintos tipos citoplasmáticos presentes en las especies. Para este caso los distintos tipos citoplasmáticos que se pudieran encontrar en la papa.

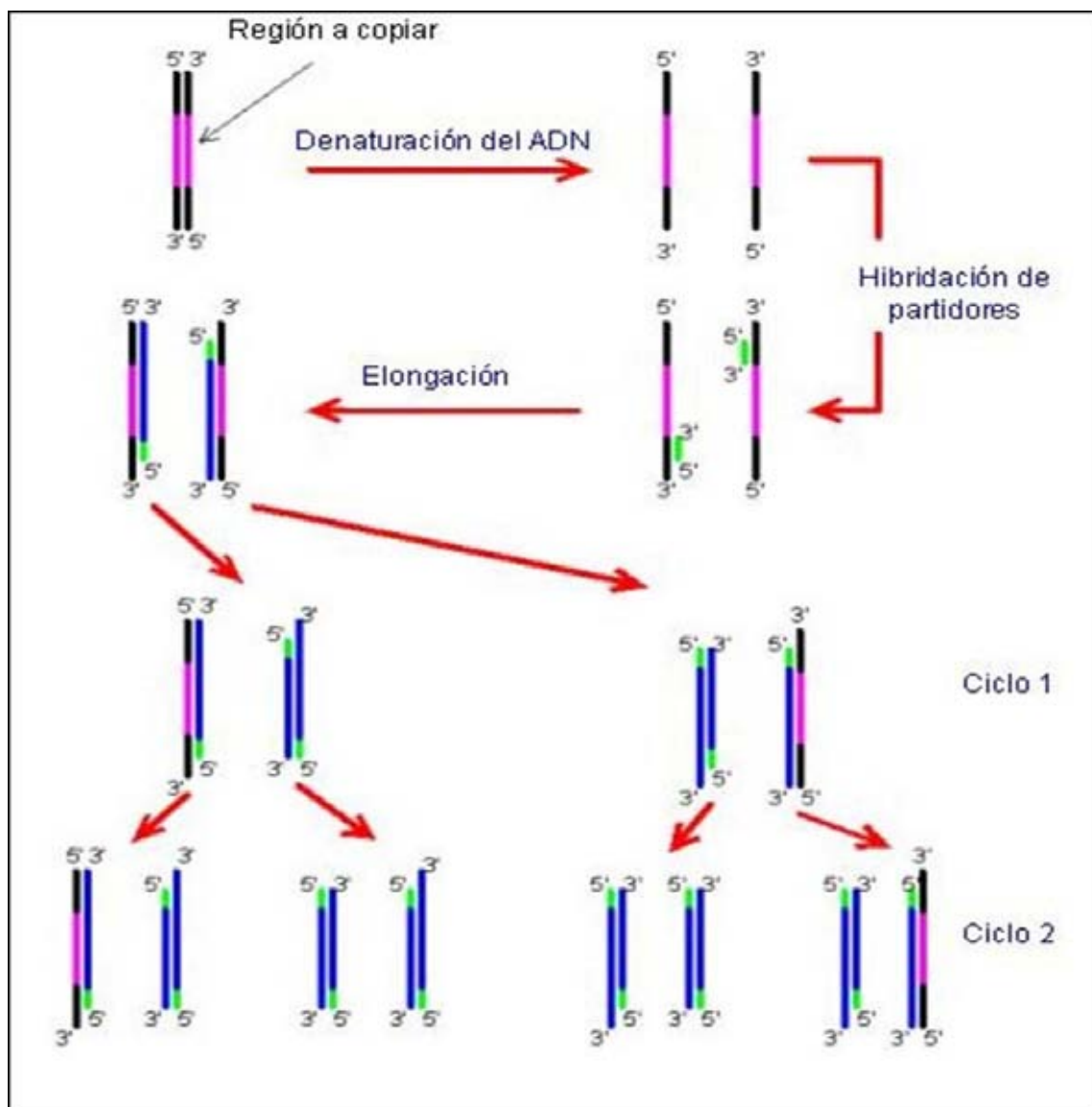


FIGURA 3 Esquema de la Reacción de la Polimerasa en Cadena (PCR).

FUENTE: <http://www.web-books.com>

2.3.2 Marcadores genotípicos del citoplasma en papa. La variación dentro del ADN del cloroplasto es común, aunque estos cambios evolucionarios son mucho más lentos que aquellos que ocurren a nivel del ADN nuclear y del ADN mitocondrial (HOSAKA y HANNEMAN, 1988b). Es por esta razón que el ADN del cloroplasto se considera como un indicador muy confiable para buscar el

origen del ancestro materno de los cultivos, y para hacer estudios de las relaciones filogenéticas existentes entre especies (HOSAKA, 2003).

Estos marcadores del cloroplasto son fáciles de utilizar, y de analizar mediante el uso de la técnica PCR, y una electroforesis en gel de agarosa (BRYAN *et al.*, 1999).

Se han realizado distintos estudios con marcadores de ADN del cloroplasto de la papa. En ellos se han determinado los niveles de variación en este organelo en la papa cultivada (*S. tuberosum* spp. *tuberosum*), y silvestre. La herencia maternal y la ausencia de recombinación en el cloroplasto ha permitido describir las relaciones filogenéticas entre distintas especies de *Solanum* (BRYAN *et al.*, 1999).

HOSAKA Y HANNEMAN (1988b), indican que aunque el ADN del cloroplasto es altamente conservado, se encontró un alto polimorfismo de éste en papas tetraploides, específicamente en la ssp. *andígena*.

Dentro de los resultados obtenidos en los estudios realizados por BRYAN *et al.*, (1999), con microsatélites en papas nativas, cultivadas, y otras solanáceas, se pueden mencionar que de 30 accesiones estudiadas de *S. tuberosum* spp. *tuberosum* (cultivadas), fue posible determinar 19 haplotipos distintos, y de las 24 accesiones de papas nativas, cada una fue un haplotipo distinto. Este nivel de diversidad tan alto se explica por la selección deliberada de los más diversos haplotipos del cloroplasto, provenientes de un análisis previo de diversidad del cloroplasto de la papa cultivada.

Al hacer comparaciones entre los marcadores nucleares con los marcadores del cloroplasto, es posible dilucidar la relativa contribución de las

semillas y del polen a la estructura genética de las poblaciones (PROVAN *et al*, 2001).

El ADN de la mitocondria, al igual que el del cloroplasto, es de herencia uniparental materna. La diferencia con el ADN del cloroplasto, como ya estaba mencionado anteriormente, es que los cambios evolucionarios en la mitocondria ocurren más rápido, por lo tanto sería menos conservado que el ADN del cloroplasto (HOSAKA y HANNEMAN, 1988).

Para el caso del ADN mitocondrial, este se encuentra mucho menos estudiado que el ADN del cloroplasto.

3 MATERIALES Y METODOS

3.1 Material vegetal.

Fueron analizadas 129 accesiones de *S. tuberosum ssp tuberosum* (Anexo 1). Se seleccionaron estas accesiones por haber sido consideradas las más representativas dentro de una colección total de 249 accesiones que forman parte del Banco de Germoplasma Chileno de Papas de la UACH. Dentro de éstas fueron incluidas accesiones nativas chilotas, accesiones provenientes de la isla de los Chonos y como referencia cultivares provenientes de Europa.

El ADN utilizado se encontraba disponible en el Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Agrarias de la UACH, el que fue extraído mediante el método de Doyle y Doyle en trabajos previos (PEREZ, 2004).

3.2 Equipos y material de laboratorio.

Dentro de los equipos utilizados se encuentran: Un refrigerador, para almacenar los reactivos que deben permanecer a -20 °C como es el caso de la Taq DNA polimerasa, las muestras de ADN y reactivos para la reacción PCR; Termociclador PTC-100™ (MJ RESEARCH) para 96 muestras, el cual se utiliza para la reacción PCR; Cámara de electroforesis horizontal para los geles de agarosa; Transiluminador (VILBERT LOURMAT) para la visualización del ADN; Horno Microondas para preparar agarosa; Micropipetas de 2µL, 10µL, 20µL, 100µL, 200µL y 1000µL (RAININ) y una pipeta multicanal de 2-20µL.

Dentro de los materiales están los que se desechan y los que se reutilizan. Los desechados son, tubos Eppendorf de 1.5mL y de 0.2mL, puntas plásticas para las micropipetas, guantes de látex, placas para PCR de 96 posillos, film de sello térmico para cubrir las placas PCR. Los materiales reutilizados son probetas de plástico, frascos SCHOTT 100, 500 y 1000mL, placa plástica, con 4 peinetas (13 posillos cada una) para la agarosa.

3.3 Amplificación específica de ADN de los citotipos mediante la reacción PCR.

La reacción PCR se llevó a cabo en el termociclador, el cual produce las diferencias de temperatura que permiten la amplificación de las hebras de ADN.

Para la amplificación se preparó un mix PCR, el que consiste en 2,5 μ L de Buffer PCR 10x, 0,8 μ L de MgCl (50 μ M), 1,0 μ L de nucleótidos (dNTP`s) (2 μ M), 0,3 μ L de enzima TAQ polimerasa (5U/ μ L), 0,5 μ L de cada partidor (10 pmol/ μ L) y 14,4 μ L de agua desionizada estéril. Por ultimo se adicionaron 5 μ L de ADN (30ng aproximadamente) de *S. tuberosum ssp tuberosum* dosificado por separado en cada pocillo de la placa PCR.

El programa utilizado en el termociclador para la amplificación de ADN descrito para los partidores ALM4 y ALM5, consiste en un ciclo de inicio a 94 °C por 4 minutos seguido de 35 ciclos, en los que se produce una denaturación del ADN a 94 °C por 30 segundos, una hibridación de partidores con secuencia complementaria de ADN debido a una reducción de la temperatura a 57 °C por 30 segundos, y una síntesis del ADN que se produce por una elevación de la temperatura a 72°C por 1,5 minutos, momento en que la enzima Taq DNA polimerasa sintetiza el ADN en dirección 3`- 5`, continuando con 7 minutos a 72°C en donde se produce una elongación final. Para finalizar la temperatura se baja a 4 °C .

El otro programa utilizado es el descrito para los partidores ALC1 y ALC3 que consiste en un ciclo de inicio a 94 °C por 4 minutos, luego 35 ciclos, que provocan la denaturalización del ADN a 94 °C por 30 segundos, una hibridación de partidores 44 °C por 30 segundos, y la síntesis del ADN con un aumento de temperatura a 72 °C por 1 minuto, a continuación le sigue un ciclo de 7 minutos a 72 °C para producir la elongación final terminando con un ciclo sin fin de 4 °C.

Los partidores PCR específicos utilizados fueron ALM4/ALM5, que sirvieron para determinar el tipo de ADN mitocondrial presente (tipo α ó tipo β) y ALC1/ALC3, con el fin de determinar el tipo de ADN del cloroplasto presente los cuales podían ser tipo T ó tipo W.

Las secuencias de los partidores utilizados para llevar a cabo la reacción PCR se describen en el Cuadro 4.

CUADRO 4 Partidores utilizados para la reacción PCR.

Partidor	Secuencia 5`-3`	Producto PCR específico para			
		T	W	α	β
ALC1	TAG AAT CAG GAG GTC TT	381bp	622bp	-	-
ALC3	TTA CTC ACG GCA ATC				
ALM4	AAT AAT CTT CCA AGC GGA GAG	-	-	2.4kb	1.6kb
ALM5	AAG ACT CGT GAT TCA GGC AAT				

FUENTE: modificado de LÖSSL *et al.* (2000).

3.4 Visualización y evaluación de fragmentos de ADN.

La visualización de los fragmentos de ADN se realizó mediante la separación electroforética en geles de agarosa

El gel de agarosa fue preparado al 1% (1g de agarosa por cada 100mL de Buffer TBE 0,5X) se utilizaron dos peinetas de 13 pocillos, es decir fue posible analizar 26 muestras a la vez. En cada pocillo se depositaron 7 μ L de producto PCR más 5 μ L de Buffer de carga (azul de bromofenol más xilencianol, productos que corren a velocidades distintas en el gel, pudiendo determinar así la ubicación aproximada de los fragmentos de ADN en relación a estos 2 componentes del buffer de carga).

Una vez cargado el gel, éste fue puesto en la cámara de electroforesis horizontal, dejándolo correr por 15 minutos a 100W para que la mezcla de producto PCR más el buffer de carga se inserte en el gel y avance por este en dirección al polo positivo. Transcurridos los 15 minutos la potencia se bajó a 50W y se dejó correr por 50 minutos más.

Finalizada la electroforésis, y con el fin de que el bromuro de etidio se intercale en las bandas de ADN, el gel debió ser sumergido aproximadamente por 30 minutos en una solución al 5%. Luego los geles fueron puestos en el transiluminador que funciona con luz UV, permitiendo finalmente la visualización de las bandas de ADN.

La evaluación se llevó a cabo visualmente comparando los fragmentos obtenidos entre ellos, y su tamaño se determinó por comparación con un marcador de peso conocido.

3.5 Análisis de datos.

Los datos del núcleo utilizados provienen del trabajo realizado previamente por PEREZ (2004), en el cual se analizaron 249 accesiones nativas de Chile y 29 accesiones antiguas europeas, mediante el uso de siete marcadores microsátélites.

El análisis de los datos se realizó por medio de la construcción de una matriz de datos. Datos que fueron ingresados en diferentes programas computacionales.

La distancia genética existente entre cada individuo y entre los cuatro citotipos, se obtuvo utilizando el programa POPGENE versión 3.2.

El índice relativo de heterocigocidad (IRH) se calculó según la fórmula propuesta por BONIERBALE *et al.* (1993):

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

Donde NA es el número de alelos detectados por loci.

La Diversidad se calculó utilizando la fórmula de NEI (1987):

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

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

Por último con el programa NTSYSpc versión 2.11Q, fue posible obtener un diagrama de coordenadas principales, las que se basan en las distancias genéticas obtenidas anteriormente. Esta herramienta permitió visualizar de una forma más simple la diversidad que existe entre los individuos, con lo que se puede obtener un acercamiento a las relaciones de parentesco que pudieran existir entre las papas nativas chilenas y las papas europeas.

4 PRESENTACION Y DISCUSION DE RESULTADOS

4.1 Tipos citoplasmáticos presentes en el Banco de Germoplasma de la Papa de la UACH.

Una vez realizados los trabajos en el laboratorio, y analizados los datos por medio de la evaluación de los geles (Figura 4), se pudo determinar la presencia de cuatro tipos citoplasmáticos diferentes. El tipo T/ β , que es el tipo citoplasmático esperado, ya que, según HOSAKA (1995, 1999) y SPOONER *et al.* (2005) este es el tipo citoplasmático característico de la especie *S. tuberosum* spp. *tuberosum*. Otro tipo encontrado es el W/ α , el cual es el tipo citoplasmático característico de la especie *S. tuberosum* ssp. *andigena*. Por último también fue posible encontrar los tipos citoplasmáticos W/ β , y T/ α .

LÖSSL *et al.* (1999), en su trabajo señala, que el ADN mitocondrial del tipo β , se encuentra asociado únicamente con el ADN del cloroplasto del tipo T, situación que podría estar reflejando una co-evolución de ambos organelos además de una común herencia uniparental. El ADN del cloroplasto tipo W se encontró principalmente asociado al ADN mitocondrial tipo α , pero, este tipo W, también fue posible encontrarlo asociado a los otros tipos mitocondriales de ADN existentes.

Sin embargo, en el presente trabajo, si fue posible encontrar los tipos de ADN del cloroplasto T y W asociados a ambos tipos de ADN mitocondriales α y β , la razón de este suceso, se discutirá más adelante.

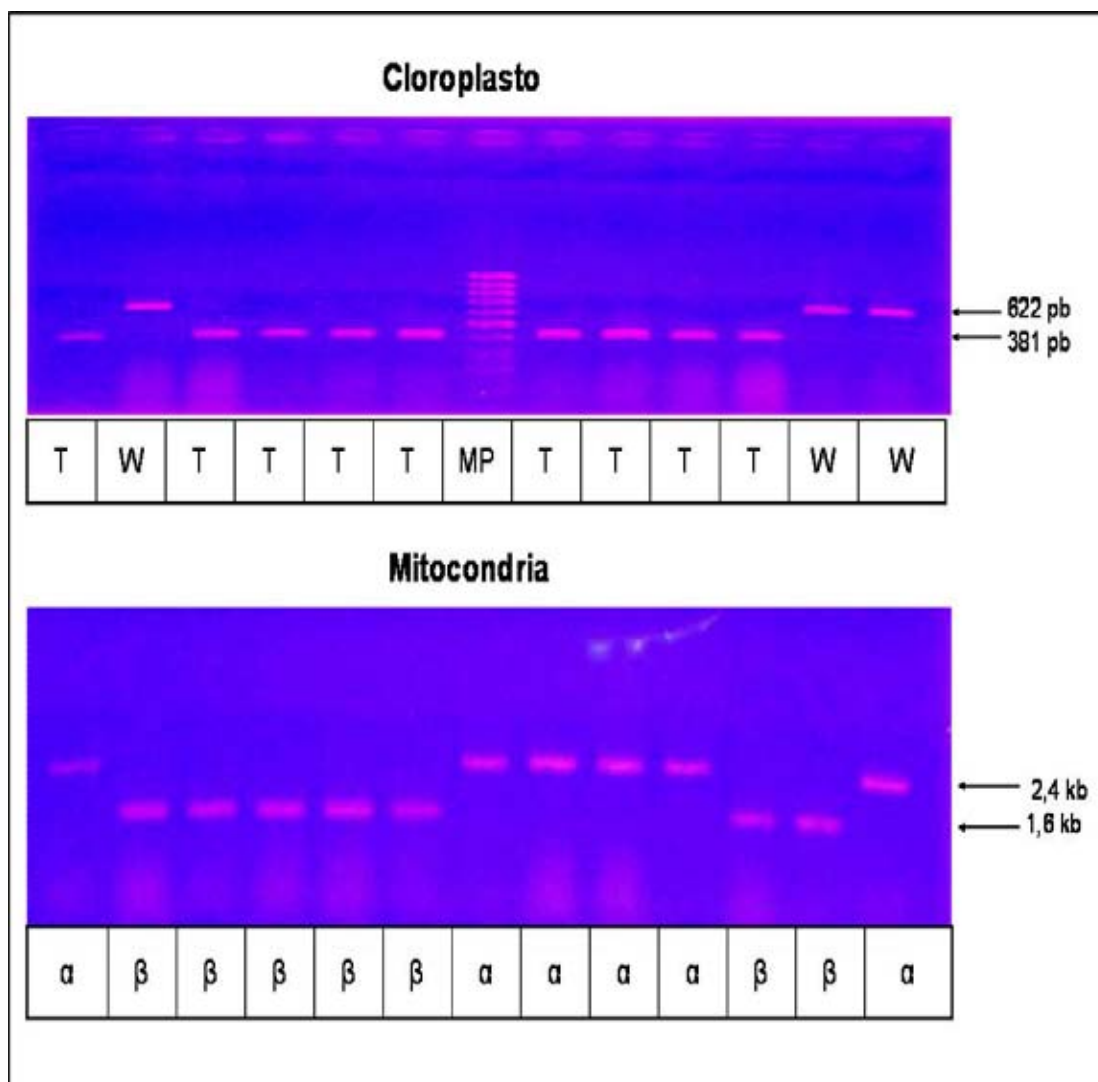


FIGURA 4 Visualización en un gel de agarosa de los tipos de ADN del cloroplasto y de la mitocondria.

En el Cuadro 5 se pueden apreciar todas las accesiones nativas chilenas analizadas en este trabajo, con su respectivo tipo citoplasmático determinado en este trabajo, en el Cuadro 6, se encuentran las accesiones europeas analizadas, con su respectivo tipo citoplasmático.

CUADRO 5 Accesiones nativas de Chile analizadas, y su tipo citoplasmático correspondiente.

Código accesión	Citotipo	Código accesión	Citotipo
084-UA-1622	T/ β	280-CON-755	W/ α
126-UA-1591	T/ β	347-CON-1125	T/ β
233-UA-1593	T/ β	006-CON-1144	T/ β
509-CON-1206	T/ β	556-UA-1600	T/ β
244-CON-1266	W/ α	195-CON-1296	T/ β
083-UA-1632	T/ β	043-UA-1258	T/ β
592-CON-1329	W/ α	070-UA-1672	T/ β
586-CON-1153	T/ β	090-UA-1034	T/ β
514-CON-974	T/ β	102-UA-1138	W/ β
517-CON-989	W/ β	181-UA-1022	T/ β
530-CON-1114	T/ β	210-UA-102	T/ β
545-CON-980	W/ α	219-UA-1534	T/ β
582-CON-977	T/ β	235-UA-1298	T/ β
011-CON-1010	T/ β	237-UA-1054	T/ β
046-CON-993	T/ α	480-UA-1143	W/ α
173-UA-1355	T/ β	049-UA-1565	T/ β
069-CON-898	T/ β	344-CON-1148	W/ α
085-CON-899	T/ β	355-CON-1148	W/ α
100-CON-832	T/ β	123-UA-1584	W/ α

(Continúa)

Continuación Cuadro 5

133-CON-1051	W/ α	588-CON-1310	T/ β
139-CON-990	T/ β	470-CON-1072	T/ β
151-CON-1025	T/ β	284-CON-815	T/ β
193-CON-1092	T/ β	328-CON-890	T/ β
203-CON-1079	T/ β	082-UA-1170	T/ β
208-CON-831	W/ α	058-CON-1041	T/ β
227-CON-824	T/ β	239-UA-1388	T/ β
229-CON-1039	T/ β	267-UA-1550	T/ β
238-CON-931	T/ β	283-UA-1108	T/ β
336-CON-784	T/ β	301-UA-1500	T/ α
362-CON-1052	W/ α	311-UA-1093	W/ β
443-CON-1146	T/ β	320-UA-1105	T/ β
453-CON-901	W/ α	322-UA-1221	T/ β
458-CON-963	T/ α	403-UA-1540	T/ β
459-CON-965	T/ β	408-UA-1167	T/ β
481-CON-1099	W/ α	411-UA-1006	T/ β
482-CON-1107	T/ β	412-UA-1641 ^a	W/ α
490-CON-988	W/ α	418-UA-1243	T/ β
NG-056	T/ β	435-UA-1279	T/ β
NG-60	T/ β	439-UA-1639	T/ β
NG-063	T/ β	488-UA-1354	W/ α

(Continúa)

Continuación Cuadro 5

NG-078	T/ β	537-UA-1224	T/ β
NG-085	T/ β	548-UA-1328	T/ β
NG-101	W/ β	563-UA-1157	T/ β
NG-112	T/ β	245-CON-1076	W/ β
NG-119	T/ β	254-CON-902	T/ β
NG-141	T/ β	275-CON-756	T/ β
NG-154	T/ β	342-CON-1015	W/ α
93-COCHRANE-14	T/ β	380-CON-1098	T/ β
93-COCHRANE-04	T/ β	397-CON-907	T/ β
93-COCHRANE-06	T/ β	420-CON-830	W/ α
93-COCHRANE-09	T/ β	421-CON-921	T/ β
317-CON-1138	T/ β	422-CON-1023	T/ β
271-CON-1123	T/ β	426-CON-926	T/ α
523-CON-1139	T/ β	NG-005	T/ β
307-CON-1127	T/ β	NG-071	T/ β
315-CON-1127	T/ β	104-UA-1395	T/ β
364-CON-1131	T/ β	313-UA-1645B	T/ β

En el Anexo 1, se pueden observar los códigos de laboratorio de cada accesión, además del lugar de colecta de cada una de ellas.

CUADRO 6 Nombre comercial, lugar de origen y el tipo de citoplasma obtenido para cada accesión europea analizada.

País de origen	Nombre cultivar	Citotipo
Holanda	Desirée	T/ β
Reino Unido	May Queen	T/ β
Alemania	Odenwalder	T/ β
Alemania	Reichskanzler	T/ β
Alemania	Wohltmann	T/ α
Suiza	Early Rose	T/ β
EEUU	Early Vermont	T/ β
Reino Unido	Flourball	W/ β
Reino Unido	Fluke	T/ β
Reino Unido	Abundance	T/ β
Reino Unido	Paterson Victoria	T/ β
Holanda	President	T/ β
Reino Unido	Champion	T/ β
EEUU	White Rose	T/ β
Reino Unido	Fortyfold	T/ β

En el Anexo 2, se pueden observar los c3digos de laboratorio de cada cultivar europeo, y el a3o de su creaci3n

4.2 Frecuencia de los citotipos.

La mayor frecuencia, corresponde al citotipo esperado T/ β abarcando sobre un 75% de los individuos analizados. El resto de los datos de frecuencia obtenidos se expresan en la Figura 5.

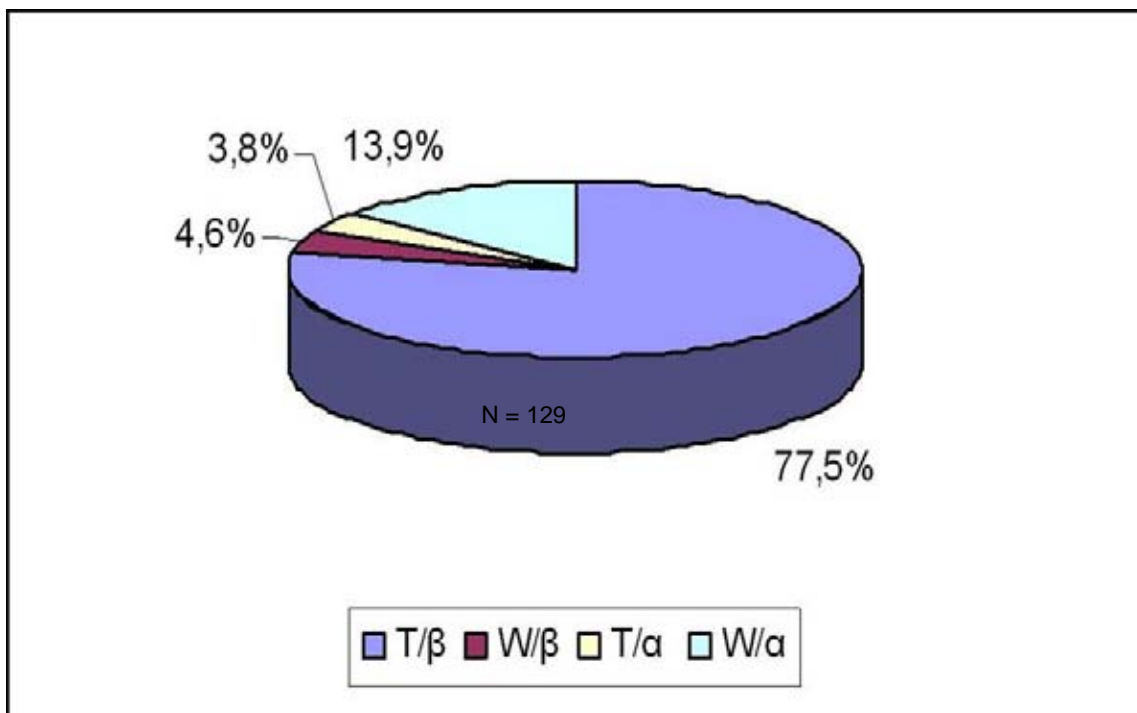


FIGURA 5 Frecuencia encontrada para los distintos citotipos.

Según Hosaka (1995), la presencia de estos 4 citotipos hoy en día se podría explicar debido al proceso evolutivo que habría dado origen a las ssp. *andígena* y *tuberosum*, el que consiste en:

- Una sucesiva domesticación de las especies diploides (silvestres).
- Posteriormente, una poliploidización sexual de la ssp andígena, momento en el cual se produjo la recombinación de estos organelos.
- Y finalmente, una selección y adaptación a días largos, formandose así a la actual papa chilena (*S. tuberosum ssp tuberosum*).

El 13.9% encontrado del citotipo W/α, es decir, el citotipo típicamente andígena, es posible explicarlo debido a la movilización de cultivares ocurrida desde los Andes hacia el sur de Chile por las manos de algunas civilizaciones indígenas que poblaban el norte altiplánico (GRUN, 1990).

Otra posible explicación para este fenómeno podría ser, el traslado desde Perú por los armadores peruanos, hecho que ocurrió antes de la incorporación de Chiloé al territorio chileno (1826), los cuales se aventuraban en travesías marítimas durante los meses de verano, llevando consigo lo necesario para su subsistencia, entre lo que se puede nombrar a las papas (OLGUÍN, 1976).

LÖSSL *et al.* (1999), al realizar el trabajo en papas europeas de caracterización del tipo de ADN mitocondrial, encontraron que de 144 cultivares, 79 poseían el ADN tipo β , típico de *S. tuberosum*, 46 poseían el ADN tipo α , y las 19 restantes poseían otros tipos no analizados en el presente estudio, lo que corresponde a frecuencias aproximadas de 55%, 32% y 13% respectivamente.

Al analizar por separado según el lugar de colecta de cada accesión, se puede decir, que las accesiones provenientes del Archipiélago de los Chonos, que corresponden a un 6.2% del total de las accesiones analizadas, presentan en su totalidad el tipo citoplasmático T/ β . Para el caso de las accesiones provenientes de la Isla de Chiloé (57% del total analizado), se encontraron los cuatro tipos citoplasmáticos, y estos se presentan en la misma proporción que la determinada para el total de las accesiones estudiadas, es decir, el citotipo predominante es el T/ β , seguido por el tipo W/ α . La existencia de estos cuatro citotipos, está indicando la presencia de la ssp. *andígena* en algún momento durante la formación de la ssp. *tuberosum*.

4.3 Análisis de diversidad.

Para estimar la diversidad genética, se determinaron distintos parámetros, entre los que se encuentran el índice relativo de heterocigocidad (IRH) y diversidad según NEI (1987).

El índice relativo de heterocigocidad (IRH) indica el grado de heterocigocidad promedio de cada grupo. Considerando que el número de alelos por individuo puede ir de uno a cuatro, esto debido al estado tetrapolide que poseen. Los individuos homocigotos (un alelo), tendrán un índice de heterocigocidad igual a 0, no así los que presenten los cuatro alelos diferentes que tendrán un valor igual a 1, lo que significa que posee 100% de heterocigocidad.

La diversidad es un valor que depende del número de alelos detectados y la frecuencia que estos alelos presenten. Para hacer los cálculos de diversidad, el tamaño de la muestra es considerada, por lo tanto, los resultados no se ven afectados por ésta. Un grupo de alta diversidad será aquel que presente un gran número de alelos de frecuencias similares.

Al comparar los resultados de diversidad y de IRH, se da que el tipo citoplasmático con la mayor diversidad es el que presenta la menor heterocigocidad, lo mismo ocurre con la menor diversidad, que va acompañada del IRH mayor. Los datos de IRH obtenidos, y la diversidad genética calculada según Nei (1987), se encuentran en el Cuadro 7

CUADRO 7. Datos de diversidad y heterocigocidad calculados para cada grupo citoplasmático encontrado.

	Diversidad h*	Heterocigocidad
T/ β	72%	40,6%
W/ β	83%	33,8%
T/ α	76%	40,5%
W/ α	69%	42,3%

* h = Nei's (1978) gene diversity

La mayor diversidad genética promedio a nivel nuclear encontrada, se presenta en el grupo de accesiones que poseen el tipo del citoplasma W/ β y corresponde a un valor de 83%. Cabe mencionar, que a pesar de que la diversidad sea la más alta dentro de una población, esto no implica que la frecuencia existente también deba ser la mayor, es decir, no existe una relación directa entre estos dos parámetros, debido a que como ya se mencionó anteriormente, la diversidad no depende del número de individuos, sino que del número de alelos presentes. Ver Figura 6.

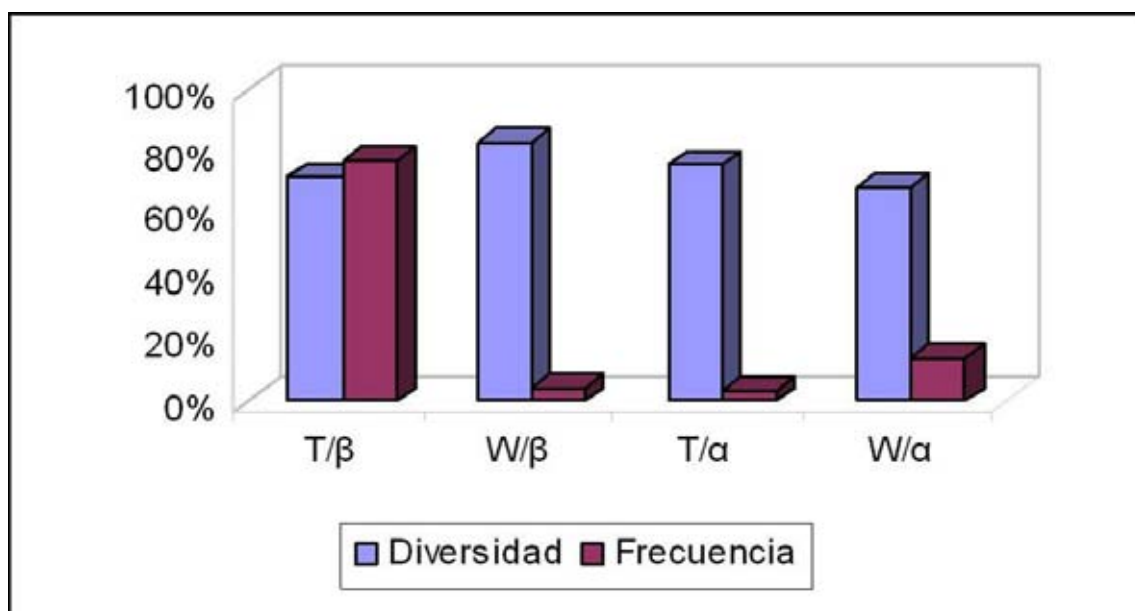


FIGURA 6 Diversidad v/s frecuencia.

Los resultados obtenidos para la diversidad concuerdan con los datos obtenidos por PEREZ (2004). Sin embargo, los resultados obtenidos para la heterocigocidad si presentan diferencias, mostrando los datos de PEREZ una variación de entre 45 y 52%, comparado con un máximo de 42% obtenidos en el presente trabajo.

PROVAN *et al.* (1996), realizaron trabajos con microsatélites en *S. tuberosum*, determinando valores de heterocigocidad que varían en un rango

que va desde 41%, hasta 92%, valores mucho más altos a los encontrados en este trabajo, y en el trabajo de PEREZ (2004).

Posteriormente PROVAN *et al.* (1999), mediante la utilización también de microsatélites encontró valores de diversidad de 76 a 78% en variedades europeas modernas de papa (*S. tuberosum* ssp. *tuberosum*), valores que son comparables con los resultados del presente estudio.

Según PEREZ (2004), los altos valores de diversidad genética encontrados en el material de papas nativas de Chile 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), citado por PEREZ (2004), 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 el mejoramiento de ésta. A su vez HOSAKA *et al.* (1988) afirman que a nivel del ADN del cloroplasto la ssp. *tuberosum* posee una diversidad mucho menor que la ssp. *andígena*. Por otro lado CARDI *et al.* (1999), señalan que a pesar de que la base genética de la papa cultivada es pequeña, el género *Solanum*, posee muchas especies útiles como fuente de variabilidad genética para el mejoramiento de la papa cultivada.

El cultivar chileno “Rough Purple Chili” fue introducido en Europa luego de que *Phytophthora infestans* (Mont) de Bary destruyera prácticamente todas las variedades presentes en el continente, fue entonces que este cultivar y sus derivados se utilizaron como parentales femeninos en los programas de mejoramiento genético. Lo más probable es que su uso exclusivo como madre se haya debido a la alta esterilidad citoplasmática que ésta y los demás

cultivares pertenecientes a la ssp *tuberosum* presentan. Esto trajo como consecuencia una gran disminución de la diversidad a nivel del citoplasma. Sin embargo, el proceso de mejoramiento genético estuvo acompañado de un alto nivel de diversidad paternal, lo que habría producido la alta diversidad encontrada hoy en día en los cultivares europeos (PROVAN *et al.*, 1999).

BRYAN *et al* (1999), presenta esta misma teoría, agregando además, que la gran mayoría de los cultivares tetraploides europeos de papa poseen un tipo único de ADN del cloroplasto, el que fuera aportado por el cultivar “Rough Purple Chili”

Esta variedad chilena, ha sido sin duda alguna, una de las más valiosas plantas introducidas, y que ha sido progenitora de un incalculable número de cultivares en todo el Mundo, las que fueron la base de las actuales variedades europeas y de América del Norte. VAN RATHLEF (1932) anota más de 650 cultivares que tenían un grado de parentesco con la variedad chilena. FUESS (1938) señala que el antiguo grupo de cultivares inglés-norteamericano provendría de material chileno 580 habría sido llevado de Chile hacia Inglaterra.

LOVE (1998) y HUTTEN (2007) indican que “Garnet Chili” es el descendiente de “Rough Purple Chili” más utilizado como parental de nuevos cultivares, y que esta es utilizada en aproximadamente el 80% de los cruzamientos como parental femenino, al igual que su antecesora.

Cabe mencionar que, de las accesiones europeas analizadas en el presente estudio, cuatro de ellas, que corresponden a “Early Rose”, “Early Vermont”, “Abundance” y “White Rose”, son descendientes de la variedad “Garnet Chili” y estas poseen como era esperado el citotipo T/ β . Para el resto de las accesiones europeas, no existe la información acerca de sus antecesores, o bien no corresponden a los originados a partir de la variedad

“Rough Purple Chili”, como es el caso de las variedades “Wohltmann” y “Flourball” las que poseen citotipos producto de una combinación entre la ssp. *tuberosum* y la ssp. *andígena* (T/α y W/β respectivamente).

4.4 Distancia genética.

Con el fin de establecer las relaciones de parentesco entre las accesiones analizadas, se calculó una matriz de distancias genéticas de NEI (1987), entre cada uno de los individuos analizados y entre los cuatro distintos citotipos encontrados, 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.

4.4.1 Distancia genética nuclear entre grupos que presentan un mismo citotipo. Las distancias genéticas fueron bajas entre los grupos de accesiones de los diferentes citotipos. La mayor distancia se produjo entre los citotipos W/β y T/α (0.0304), y la menor entre los citotipos T/α y W/α (0.0116).

Las distancias genéticas obtenidas se observan en el Cuadro 8.

CUADRO 8 Distancias genéticas entre cada citotipo, obtenidas mediante el programa pop gene versión 3.2.

	T/β	W/β	T/α	W/α
T/β	****			
W/β	0.0214	****		
T/α	0.0202	0.0304	****	
W/α	0.0204	0.0228	0.0116	****

En la Figura 7 se grafican las distancias genéticas existentes entre los grupos T/ β , W/ β , T/ α , W/ α .

Las bajas distancias entre los grupos dejan claro el alto nivel de parentesco que existe entre las accesiones estudiadas (chilotas, europeas, y provenientes de la Isla de los Chonos).

LÖSSL *et al.* (1999), al estudiar cultivares de papa originarias de Alemania utilizando la técnica RFLP, encontraron que la distancia genética, entre los tipos de ADN α y β era de 0,3, valor que se encuentra muy por encima en comparación con los valores encontrados en el presente estudio para la distancia existente entre cada citotipo.

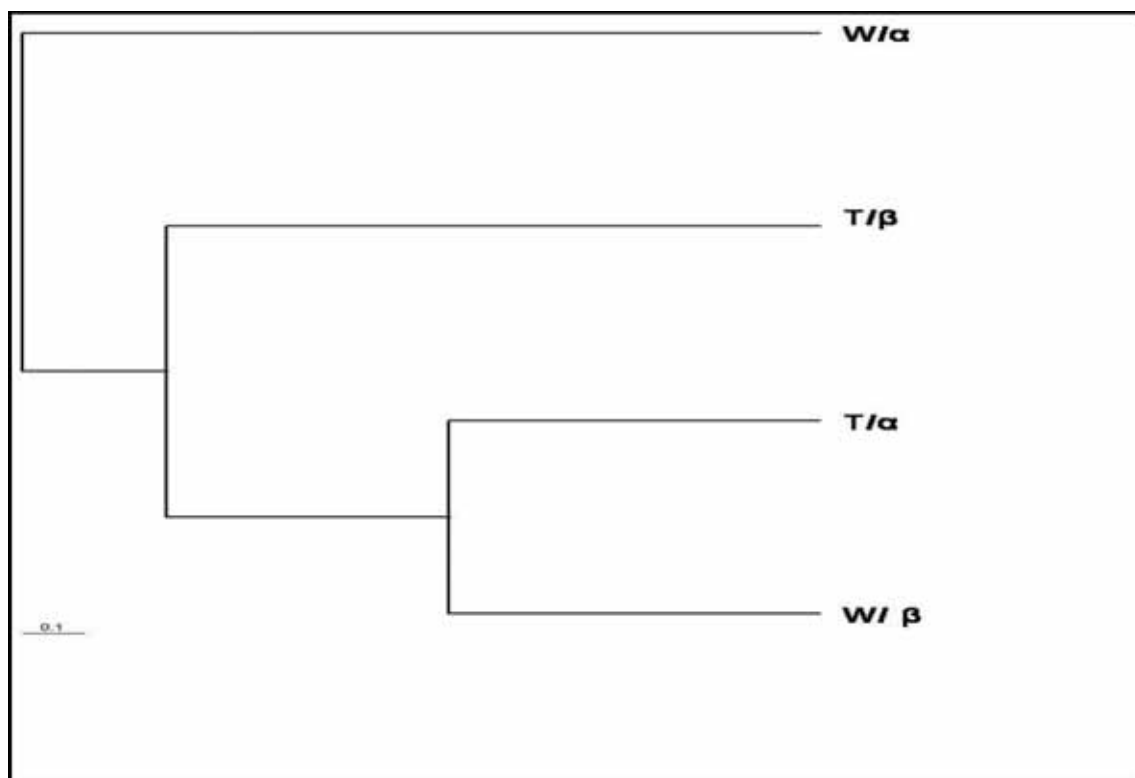


FIGURA 7 Dendrograma obtenido en base a las distancias genéticas (NEI, 1987) entre grupos T/ β , W/ β , T/ α , W/ α mediante la variación alélica de SSRs del núcleo.

4.4.2 Distancia genética 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 8 con un diagrama en dos dimensiones.

Como se puede observar en el diagrama, no existe una clara formación de grupos según el tipo de citoplasma.

La mayor distancia genética entre los individuos, se presentó entre 239-UA-1388 y 517-CON-989 obteniendo un valor de 0,85. Por otro lado la menor distancia tuvo un valor de 0,03, la que se encontró entre los individuos 458-CON-963 y 490-CON-988. Cabe mencionar que las accesiones 517-CON-989, 556-UA-1600, 123-UA-1584, 100-CON-832, Ratte, NG-112, Dessire, NG-005, presentan en general las mayores distancias genéticas, al compararlas individualmente con las otras accesiones.

Dentro de las accesiones que presentan el citotipo T/ β , encontramos a los individuos Dessirée y 100-CON-832, y al compararlos individualmente, encontramos que son los que se encuentran más alejados uno del otro dentro de este grupo, teniendo la distancia un valor de 0,76, situación que se puede observar en la Figura 9.

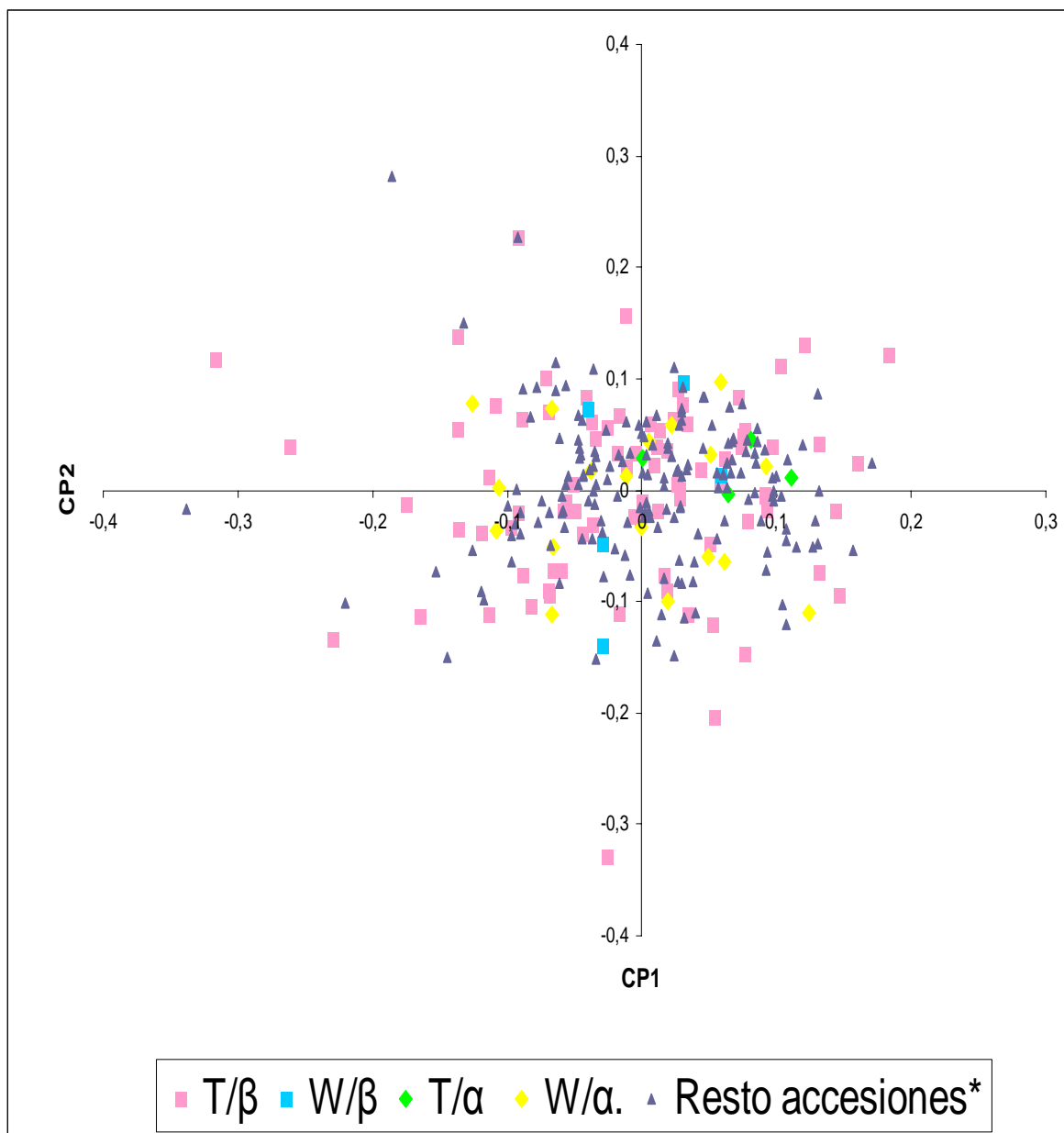


FIGURA 8 Diagrama de coordenadas principales basado en las distancias genéticas existentes entre los individuos analizados.

* Se considera resto de accesiones a aquellas que no fueron analizadas citoplasmáticamente, pero si se posee la información del núcleo.

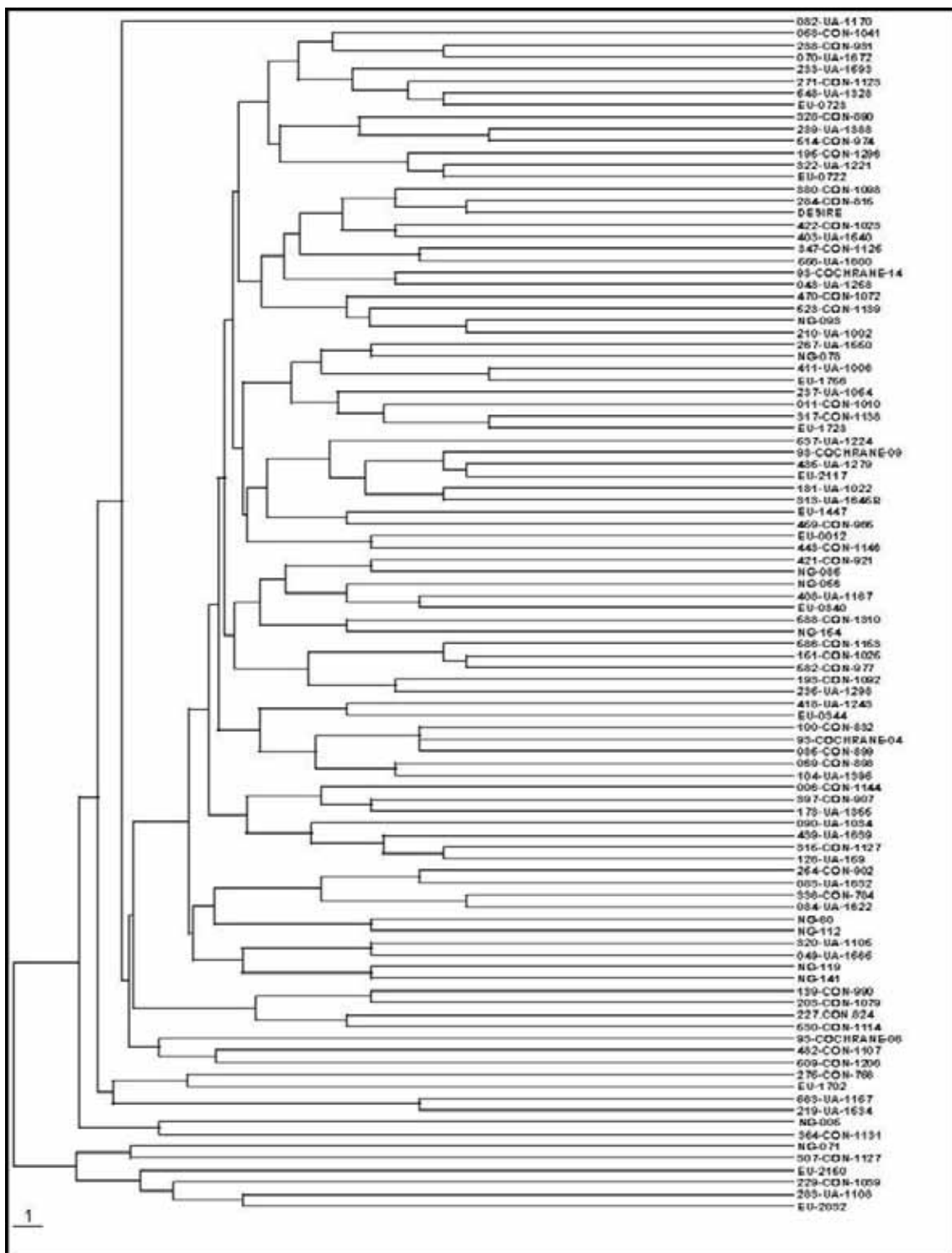
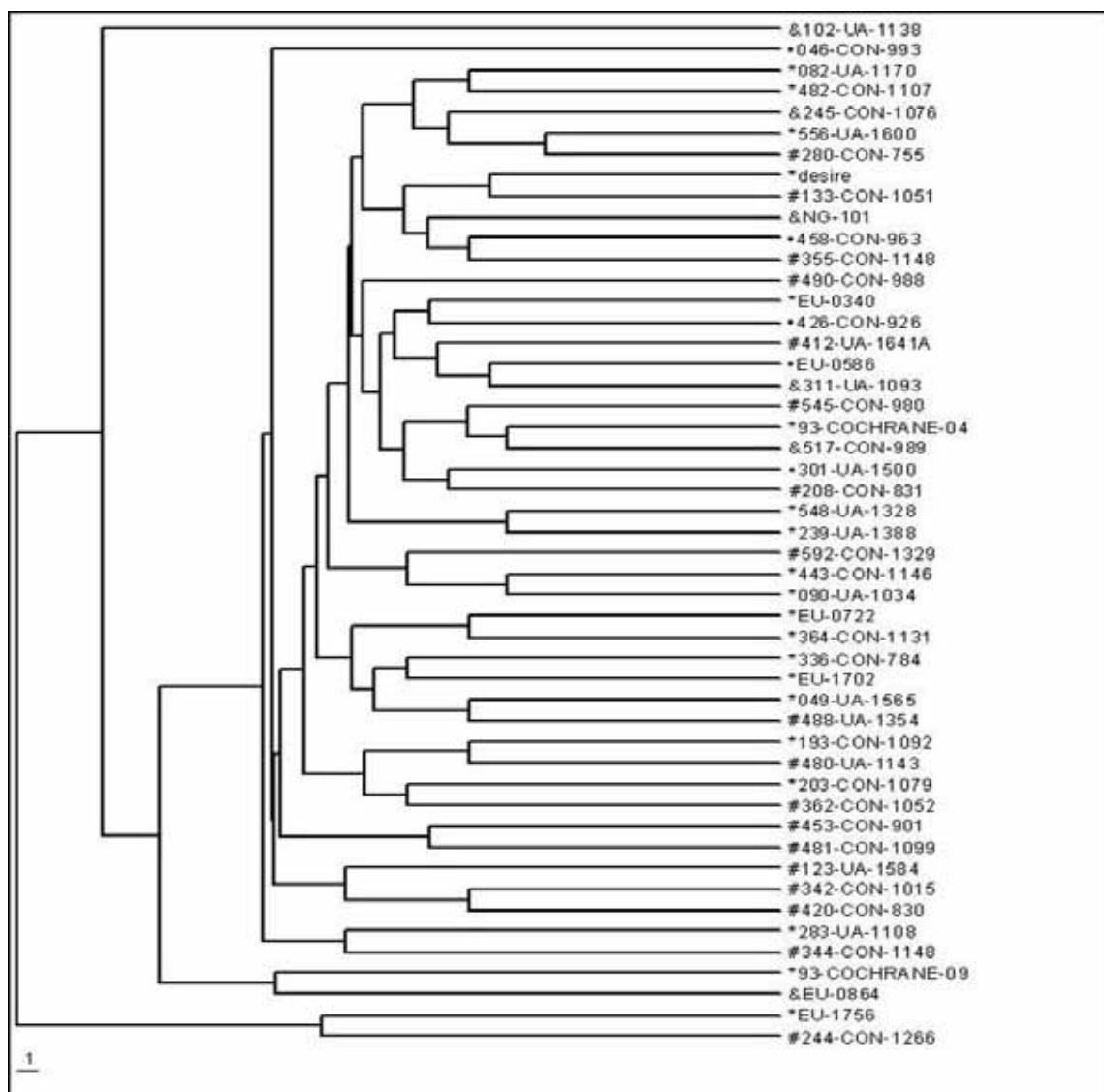


FIGURA 9 Dendrograma de las accesiones de papas con el citotipo T/ β , obtenido en base a las distancias genéticas (NEI, 1987) mediante la variación alélica de SSRs del núcleo.

Al comparar los individuos 514-CON-974, perteneciente al citotipo T/ β , y 362-CON-1052, perteneciente al citotipo W/ α , encontramos que a pesar de pertenecer a grupos distintos éstos presentan una distancia mínima entre ellos, teniendo un valor de 0,07 (Figura 10).



* = T/ β , # = W/ α , • = T/ α , & = W/ β

FIGURA 10 Dendrograma de las accesiones de papas de los citotipos W/ β , T/ α , W/ α , y la porción más representativa de las accesiones T/ β , obtenido en base a las distancias genéticas (NEI, 1987) mediante la variación alélica de SSRs del núcleo.

Estas dos situaciones, se podrían explicar por medio de la teoría de LÖSSL *et. al.* (2000) quienes sostienen que hasta ahora no existen indicaciones de que las variedades que poseen un mismo tipo citoplasmático, puedan ser agrupadas en un mismo nivel del genoma nuclear, ya que aparentemente los alelos nucleares son distribuidos en forma independiente al de los alelos citoplasmáticos.

PROVAN (1996), al determinar la distancia genética existente entre las accesiones analizadas de *S. tuberosum*, pudo encontrar que esta varía en un rango entre los valores 0.44 y 0.81. Si bien los valores más bajos encontrados en su trabajo, son mucho más altos que los que se presentan en este estudio, los valores más altos, si coinciden con los aquí encontrados, denotando una menor relación genética entre todas las accesiones que él analizó.

La baja distancia que existe entre algunos individuos, deja en evidencia la existencia de que el material presenta una altísima similitud genética entre ellos. Si bien, se encontró un patrón genético único para el 99,2% de las accesiones analizadas por PEREZ (2004), cabe la posibilidad de que un pequeño número de estos individuos correspondan a duplicados que no fueron identificados como tal, por algún error en la evaluación. Pero, también es posible que al utilizar un mayor número de marcadores estas diferencias se hagan mas marcadas.

Para corroborar lo anterior, es interesante mencionar el caso de las accesiones 267-UA-1550 y 283-UA-1108, las cuales presentan una distancia genética entre ellas igual 0, lo que nos estaría indicando la presencia de individuos duplicados.

PEREZ (2004), señala, que 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.

5 CONCLUSIONES

Mediante la utilización de marcadores PCR específicos del ADN del cloroplasto y la mitocondria, fue posible encontrar cuatro combinaciones del ADN del cloroplasto con la mitocondria es decir, cuatro citotipos distintos, los que fueron T/ β , W/ β , T/ α y W/ α .

El tipo citoplasmático T/ β , característico de *Solanum tuberosum* ssp *tuberosum*, es el que se encuentra en mayor proporción dentro de las muestras analizadas.

La presencia de estos cuatro tipos citoplasmáticos distintos permiten concluir, que la ssp. *andígena*, si estuvo presente en algún momento del origen de la ssp. *tuberosum*.

La mayor diversidad genética, se encuentran en el grupo de accesiones que presentan el citotipo W/ β (83%), y la menor la presentan las accesiones pertenecientes al citotipo W/ α (69%).

El índice relativo de heterocigocidad (IRH) obtenida para los grupos varió entre 33% y 42%, encontrándose estos resultados en el citotipo W/ β , y W/ α respectivamente.

Las bajas distancias genéticas existentes entre los grupos de accesiones que presentan los distintos citotipos, y la alta variación que hay entre los individuos, no permitieron formar una agrupación clara.

Las accesiones de papa analizadas corresponden a variedades distintas, sin embargo, estas se encuentran estrechamente emparentadas unas con otras, lo que estaría indicando la existencia de un ancestro en común para ellas.

6 RESUMEN

La zona sur de Chile es considerada como subcentro de origen de la papa cultivada (*S. tuberosum* ssp. *tuberosum*), es por esta razón que en la Universidad Austral de Chile (UACH) se formó el Banco de Germoplasma. Las accesiones pertenecientes a este Banco Genético provienen de colectas realizadas principalmente en la Isla de Chiloé, y la Isla de los Chonos.

Las accesiones pertenecientes a la colección de la UACH ya fueron caracterizadas molecularmente a nivel nuclear (ADN), pero no han sido caracterizadas citoplasmáticamente. El objetivo principal de esta tesis fue determinar los distintos tipos citoplasmáticos presentes en papa y relacionarlos con la diversidad del núcleo.

Mediante la utilización de los marcadores PCR específicos del cloroplasto ALC1/ALC3, y los marcadores de la mitocondria ALM4/ALM5, se analizaron 129 accesiones, de un total de 249 existentes en el Banco de Germoplasma de la UACH.

Fue posible encontrar cuatro tipos citoplasmáticos distintos. Las frecuencias encontradas para cada tipo citoplasmático fueron, 77.5% para el tipo citoplasmático T/ β , 13.9% para W/ α , 4.6% para W/ β , y 3.8% para T/ α . Esto concuerda con que la mayoría de las papas cultivadas poseen el citotipo T/ β . por otra parte el citotipo W/ α sería el característico de las especies silvestres de América, incluida la ssp. *andígena*.

Las diversidades encontradas para las accesiones pertenecientes a cada grupo citoplasmático, fueron 72% para T/ β , 69% para W/ α , 83% para W/ β , y 76% para T/ α . Esta alta diversidad presentada por cada grupo fue acompañada por un índice de heterocigocidad que varía entre 33% y 40%. Las bajas distancias genéticas nucleares y la alta variación existente entre las accesiones presentes en cada grupo, y las existentes entre los individuos analizados, no permitieron formar una agrupación clara.

SUMMARY

South Chile is considered the subcenter of origin of the potato (*S. tuberosum* ssp. *tuberosum*). Therefore, at the Universidad Austral de Chile (UACH) the gene bank was created. Accessions belonging to the gene bank come from gatherings carried out in the Islands of Chiloé and Chonos.

Accessions belonging to the UACH collection have already been molecularly characterized at nuclear level (DNA), but have not been characterized cytoplasmically. The main purpose of this dissertation was to determine the different cytoplasmic types found in potato and to relate them with the diversity of the nucleus.

By using specific PCR markers ALC1/ALC3 from chloroplast and ALM4/ALM5 from mitochondria, 129 accessions were analyzed from a total number of 249 existing in the germplasm bank of the UACH.

It was possible to find four different cytoplasmic types. The frequencies found for each cytoplasmic type were 77.5 % for T/ β cytoplasmic type, 13.9% for W/ α , 4.6% for W/ β and 3.8% for T/ α . This it agrees with that the most cultivated potato varieties have a T/ β cytoplasmic type, on the other hand the W/ α cytoplasmic type it would be characteristic of the wild species in South America, included the ssp. *andigena*.

Diversities found for cytoplasmic groups were 72% for T/ β , 69% for W/ α , 83% for W/ β , and 76% for T/ α . This high diversity shown by each group included a rate of heterozygosity which varies between 33% and 40%. The low nuclear genetic distances and the high variety existing among accessions in each group and those existing among studied individuals, did not allow a clear grouping in any of the cases.

7 BIBLIOGRAFIA

- BECERRA, V., y PAREDES, C. 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. *Theoretical and Applied Genetics* 86: 481-491.
- BRYAN, G., McNICOLL, J., RAMSAY, G., MEYER, R. y DE JONG, W. 1999. Polymorphic simple sequence repeat markers in chloroplast genomes of Solanaceous plants. *Theoretical and Applied Genetics* 99: 859 – 867.
- BUKASOV, S. M. 1933. The Potatoes of South America and their Breeding Possibilities. Suppl. 58, Bull. Appl. Bot. Genet. Pl. Breed. Leningrad
- CAMPOS, H. 1995. Marcadores moleculares: conceptos. *Agro Sur (Chile)* 23(1): 68 – 75.
- CARDI, T., BASTIA., MONTI, L., y EARLE, E.D. 1999. Organelle DNA and male fertility variation in *Solanum* spp. and interespecific somatic hybrids. *Theoretical and Applied Genetics* 99: 819 – 828
- CLAROS, M. 2004. Marcadores moleculares: Qué son, cómo se obtienen y para qué valen (On Line). <<http://www.ciencias.uma.es/publicaciones>> (18 sept. 2004).

- CONTRERAS, A., ARUTA, C., BANSE, J., FUENTEALBA, J., MORA, S Y RUSCHE, H. 1979. Germoplasma chileno de papa (*Solanum tuberosum* L). Informe anual 1978. Universidad Austral de Chile. Facultad de Ciencias Agrarias. Instituto de Producción Vegetal. Valdivia. 20 p
- CONTRERAS, A. 1987. Germoplasma chileno de papas (*Solanum spp.*). In: Contreras, A y Esquinas-Alcázar (eds). Anales Simposio Recursos Fitogenéticos: 20-22 noviembre de 1984, Valdivia. Universidad Austral de Chile e International Board for Plant Genetic Resources (IPBGR). pp: 43-75.
- CONTRERAS, A. y MANCILLA, R. 1989. Electroforesis de proteínas y esterases como método químico de identificación en papas. Turrialba (Costa Rica) 39(2): 193-198.
- CONTRERAS, A., ALBERDI, M., ANDRADE, N., BÖHM, L., CIAMPI, L., FUENTEALBA, J., MEZA, L., ROMERO, M Y SEEMANN, P. 1992. Recolección, mantención, evaluación y uso potencial de la papa nativa y parientes relacionados. Simiente 62(2):61-72.
- CONTRERAS, A. 1999 . Germoplasma chileno de papa (*Solanum spp.*). (On line)
<http://www.agrarias.uach.cl/instituto/prod_sanidad_vegetal/webpapa>
(15 sept. 2004).
- CONTRERAS, A. 2000. Colectas de *Solanum* en Chile y su mantención. In: Congreso Iberoamericano de investigación desarrollo en patata. España. 350 p.

- DE VICENZI, C. 2006. Anormalidades florales y factores citoplasmáticos que afectan la fertilidad del germoplasma chileno de papas (*Solanum tuberosum* L. ssp *tuberosum* Hawkes). Tesis Lic. Agr. Valdivia. Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias. 97p.
- ESTRADA, N. 2000. La biodiversidad en el mejoramiento genético de la papa. Bolivia. 372p.
- FUESS, W. 1938. Die geschichte der Kartoffel. Deutsche Zentralbrucherei Aktien gesellschaft. Berlin 95 p.
- GAY, C. 1831. Sobre la verdadera patria de la papa. El Araucano. 41(26):6.
- GLENDINNING, D.R. 1983. Potato introductions and breeding up to the early 20th century. New Phytologist 94:479-505.
- GRUN, P. 1990. The Evolution of cultivated potatoes. Economic Botany. 44(Suppl.): 39-55.
- HAWKES, J y HJERTING, J. 1969. The potatoes of Argentina, Brazil, Paraguay and Uruguay. A biosystematics study. Londres, Inglaterra. Oxford University. 525p.
- 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.
- HOSAKA, K., Y HANNEMAN RE. 1988 (a). The origin of the cultivated tetraploid potato based on chloroplast DNA. Theoretical and Applied Genetics 76:172-176
- HOSAKA, K., Y HANNEMAN RE. 1988 (b). Origin of chloroplast DNA diversity in the Andean potatoes. Theoretical and Applied Genetics 76:333-340.
- HOSAKA, K., de ZOETEN, G.A., HANNEMAN, Jr. 1988. Cultivated potato chloroplast DNA differs from the wild type by one deletion – Evidence and implications. Theoretical and Applied Genetics 75: 741-745.
- HOSAKA, K. 1995. Successive domestication and evolution of the Andean potatoes as revealed by chloroplast DNA restriction endonuclease analysis. Theoretical and Applied Genetics 90: 356-363
- HOSAKA, K. 2003. T – type chloroplast DNA in *Solanum tuberosum* L. ssp. *tuberosum* was conferred from some populations of *S. tarijense* Hawkes. American Journal of Potato Research 80: 21 – 32.
- HOSAKA, K. 2004. Evolutionary pathway of T – type chloroplast DNA in potato. American Journal of Potato Research 81:153-158.

- HOUHAS, R. y ROSS, R. 1956. The use of foreign introductions in breeding American Potato varieties. *American Potato Journal*. 33: 328-339.
- HUAMAN, Z. y SPOONER, D. 2002. Reclassification of landrace populations of cultivated potatoes (*Solanum* SECT. Petota). *American Journal of Botany* 89(6): 947-965.
- HUTTEN, R. 2007. potato pedigree database. (On line) <www.dpw.wageningen-ur.nl> (01 mar 2007)
- KAWAGOE, Y., KIKUTA, Y. 1991. Chloroplast DNA evolution in potato (*Solanum tuberosum* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 81(1): 13-20.
- KELLER, C. 1952. Introducción. *En*: Medina, J.T.: Los aborígenes de Chile. Fondo Histórico y Bibliográfico: VII-LXXII.
- LÖSSL, A., ADLER, N., HORN, R., FREI, U., y WENZEL, G. 1999. Chondriome – type characterization of potato: mt α , β , γ , δ , ϵ and novel plastid-mitochondrial configurations in somatic hybrids. *Theoretical and Applied Genetics* 98: 1 – 10.
- LÖSSL, A., GÖTZ, M., BRAUN, A. y WENZEL, G. 2000. Molecular markers for cytoplasm in potato: male sterility and contribution of different plastid-mitochondrial configurations to starch production. *Euphytica* 116: 221-230
- LOVE, S. 1998. Founding clones, major contributing ancestors, and exotic progenitors of prominent North American Potato Cultivars. (On line) <http://potatokorea.com> (01 mar 2007).

- LUJAN, L. 2001. Historia de la papa (On line) <[www. reddepapa.org/lujan.pdf](http://www.reddepapa.org/lujan.pdf)> (18 sept. 2004).
- MACIAS, M., MANCILLA, R. y CONTRERAS, A. 1989. Identificación de clones de papa chilena (*Solanum tuberosum* ssp. *tuberosum*) por electroforesis de proteínas y esterases. *Agro Sur (Chile)* 17(1): 56-63.
- MATSUBAYASHI, H. 1991. Phylogenetic relationship in the potato and its related species in chromosome engineering in plants: genetic, breeding, evolution, part B. (eds) Tsuchiya and Gupta. Elsevier, Science Publications B.V. Amsterdam: 93 188.
- MONTALDO, A y SANZ. C.1962. Las especies de papas silvestres y cultivadas de Chile. *Agricultura técnica.* (2):66- 152.
- NEI, M. 1987. *Molecular population genetic and evolution.* New York. Columbia University Press. 512 p.
- OCHOA, C. 1972. Un nuevo taxon y sinonimia de algunas especies tuberíferas peruanas de *Solanum*. *Darwiniana* 17: 416–432.
- O`COMPLEY, C. 1937. Papa chilota = Oro chilote = Riqueza chilena. *Rev. Turismo Austral* 3 (34):7.
- OLGUIN, C. 1976. Chiloé y su historia. *Revista de la Universidad de Chile, vicerrectoría de extensión y comunicaciones* 1(31)
- PEREZ, J. 2004. 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

Lic. Agr. Valdivia. Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias. 97p.

PLAISTED, R. y HOOPEES, R. 1989. The past record and future prospects for the use of exotic potato germplasm. *American Potato Journal*. 66: 603-627.

PROVAN. J., POWEL, W., WAUGH, R. 1996. Microsatellite analysis of relationships within cultivated potato (*Solanum tuberosum*). *Theoretical and Applied Genetics* 92:1078-1084.

PROVAN, J., POWELL, W., DEWAR, W H., BRYAN, G., MACHRAY, C y WAUGH, R. 1999. An extreme cytoplasmic bottleneck in the modern European cultivated potato (*Solanum tuberosum*) is not reflected in decreased levels of nuclear diversity. *Proceedings of Royal Society of London. B*. 266: 633-639.

PROVAN, J. POWELL, W. y HOLLINGSWORTH, P. 2001. Chloroplast microsatellites: new tools for studies in plant ecology and evolution. *Trends in ecology & evolution* 16(3): 142 – 147.

ROSS, H. 1986. Potato breeding : problems and perspectives. In: W. Horn, G. Robbelen & P. Parey (Eds). *Journal of Plant Breeding (Suppl.13)*:1-132. Berlin.

RUSSEL, P. 2002. Non-mendelian inheritance. *In: Genetics*. Russel, P (eds). Pearson education. San francisco. pp: 412-434.

SIEBENEICK, H. 1948. Die deutschen und ausländischen kartoffelsorten 1947/48. *Schriftenreihe für die kartoffelwirtschaft*. heft 2 und 3.

- 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.
- SPOONER, D.M., MCLEAN, K., RAMSAY, G., WAUGH, R., y BRYAN, G.J. 2005. A single domestication for potato based on multilocus AFLP genotyping. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 102(41):14694-14699.
- STOLOVITZKI, G. y CECCHI, G. 1996. Efficiency of DNA replication in the polymerase chain reaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 93: 12947-12952.
- SUKHOTU, T., KAMIJIMA, O., y HOSAKA, K. 2004. Nuclear and chloroplast DNA differentiation in Andean potatoes. *Genome* 47(1): 46-56
- SYKIN, A. G. 1971. Zur Frage der Abstammung und der wildwachsenden Vorfahren chilenischer Kultur Kartoffeln. *Z. Pflanzenzüchtung* 65:1-14.
- VAN RATLEF, H. 1933. Die Stammtafeln des Weltsortiments der Kartoffeln und ihre generative furchtbaren Sorten. *Kühn- Archiv*. 33:296-431.
- ZHANG, Q., LIU, Y y SODMERGEN. 2003. Examination of the cytoplasmic DNA in male reproductive cells to determine the potential for cytoplasmic inheritance in 295 angiosperm species. *Plant and Cell Physiology* 44 (9):941-951. Original no consultado. (On line) <<http://pcp.oxfordjournals.org/cgi/content/abstract/44/9/941>> (10 oct. 2006).

ANEXOS

ANEXO 1 Acciones nativas. Con sus respectivos códigos de accesoión, y de laboratorio, además de su lugar de colecta.

Lugar de colecta	Código laboratorio	Código accesoión	Lugar de colecta	Código laboratorio	Código accesoión
Aysén	Aysen217c	084-UA-1622	Isla Navarino	INavarino57c	280-CON-755
Aysén	Aysen223c	126-UA-1591	Chonos	IPangu68s	347-CON-1125
Aysén	Aysen246c	233-UA-1593	Chonos	IStok15s	006-CON-1144
Cautín	Cautin100c	509-CON-1206	Manihuales	Mani320c	556-UA-1600
Chiloé	Cautin49c	244-CON-1266	S.I	P-042	195-CON-1296
Chaiguén	Chaig216c	083-UA-1632	S.I	P-212	043-UA-1258
S.I.	Chapi116	592-CON-1329	S.I.	P-214c	070-UA-1672
Chefamite	Chefa113s	586-CON-1153	S.I.	P-218	090-UA-1034
Chiloé	Chilo101c	514-CON-974	S.I.	P-220	102-UA-1138
Chiloé	Chilo102c	517-CON-989	S.I.	P-231	181-UA-1022
Chiloé	Chilo106c	530-CON-1114	S.I.	P-239	210-UA-1002
Chiloé	Chilo107c	545-CON-980	S.I.	P-242	219-UA-1534
Chiloé	Chilo111c	582-CON-977	S.I.	P-247	235-UA-1298
Chiloé	Chilo18c	011-CON-1010	S.I.	P-249	237-UA-1054
Chiloé	Chilo21c	046-CON-993	S.I.	P-295	480-UA-1143
Chiloé	Chilo228c	173-UA-1355	Palena	Pale213c	049-UA-1565
Chiloé	Chilo24c	069-CON-898	Playas Largas	PlayaL67c	344-CON-1148

Lugar de colecta	Código laboratorio	Código accesión	Lugar de colecta	Código laboratorio	Código accesión
Chiloé	Chilo26s	085-CON-899	Playas Largas	PlayaL70c	355-CON-1148
Chiloé	Chilo28	100-CON-832	Lago Rosselot	Rosse222c	123-UA-1584
Chiloé	Chilo30c	133-CON-1051	S.I.	Socai114c	588-CON-1310
Chiloé	Chilo32c	139-CON-990	S.I.	Tarapa90s	470-CON-1072
Chiloé	Chilo34c	151-CON-1025	Chiloe	TChilo058c	284-CON-815
Chiloé	Chilo41c	193-CON-1092	Chiloe	TChilo064	328-CON-890
Chiloé	Chilo44c	203-CON-1079	Chiloe	TChilo215	082-UA-1170
Chiloé	Chilo45c	208-CON-831	Chiloe	TChilo22c	058-CON-1041
Chiloé	Chilo46c	227-CON-824	Chiloe	TChilo250c	239-UA-1388
Chiloé	Chilo47c	229-CON-1039	Chiloe	TChilo253c	267-UA-1550
Chiloé	Chilo48	238-CON-931	Chiloe	TChilo255	283-UA-1108
Chiloé	Chilo65c	336-CON-784	Chiloe	TChilo258	301-UA-1500
Chiloé	Chilo71c	362-CON-1052	Chiloe	TChilo261	311-UA-1093
Chiloé	Chilo84c	443-CON-1146	Chiloe	TChilo263	320-UA-1105
Chiloé	Chilo85	453-CON-901	Chiloe	TChilo264	322-UA-1221
Chiloé	Chilo87c	458-CON-963	Chiloe	TChilo274c	403-UA-1540
Chiloé	Chilo88c	459-CON-965	Chiloe	TChilo275	408-UA-1167
Chiloé	Chilo92	481-CON-1099	Chiloe	TChilo276	411-UA-1006
Chiloé	Chilo93c	482-CON-1107	Chiloe	TChilo277	412-UA-1641A
Chiloé	Chilo94c	490-CON-988	Chiloe	TChilo278	418-UA-1243
Chiloé	ChiloNG164	NG-056	Chiloe	TChilo283	435-UA-1279
Chiloé	ChiloNG165	NG-60	Chiloe	TChilo285c	439-UA-1639

Lugar de colecta	Código laboratorio	Código accesión	Lugar de colecta	Código laboratorio	Código accesión
Chiloé	ChiloNG166	NG-063	Chiloe	TChilo297c	488-UA-1354
Chiloé	ChiloNG171	NG-078	Chiloe	TChilo311	537-UA-1224
Chiloé	ChiloNG174	NG-085	Chiloe	TChilo315c	548-UA-1328
Chiloé	ChiloNG185	NG-101	Chiloe	TChilo323	563-UA-1157
Chiloé	ChiloNG191	NG-112	Chiloe	TChilo50c	245-CON-1076
Chiloé	ChiloNG194	NG-119	Chiloe	TChilo52	254-CON-902
Chiloé	ChiloNG203	NG-141	Chiloe	TChilo56c	275-CON-756
Chiloé	ChiloNG207	NG-154	Chiloe	TChilo66c	342-CON-1015
Cochrane	Coch10	93-COCHRANE-14	Chiloe	TChilo75c	380-CON-1098
Cochrane	Coch3	93-COCHRANE-04	Chiloe	TChilo77	397-CON-907
Cochrane	Coch5	93-COCHRANE-06	Chiloe	TChilo78c	420-CON-830
Cochrane	Coch8	93-COCHRANE-09	Chiloe	TChilo79s	421-CON-921
Chonos	Gaviot63s	317-CON-1138	Chiloe	TChilo80c	422-CON-1023
Chonos	Gorbea55c	271-CON-1123	Chiloe	TChilo81	426-CON-926
Chonos	IBoya104s	523-CON-1139	Chiloe	TChiloNG147	NG-005
Chonos	IBoya59s	307-CON-1127	Chiloe	TChiloNG169	NG-071
Chonos	IBoya62s	315-CON-1127	Valdivia	Val221c	104-UA-1395
Chonos	IBoya72s	364-CON-1131	Varadero Tiburón	Varade262s	313-UA-1645B

Anexo 2 Códigos de laboratorio de cada cultivar europeo, y el año de su creación

Código laboratorio	Código colección	Nombre cultivar	año creación
Desire351	desire	Desiree	1962
EU326	EU-0012	May Queen	1896
EU328	EU-0340	Odenwälder	1908
EU329	EU-0344	Reichskanzler	1886
EU332	EU-0586	Wohltmann	1895
EU335	EU-0722	Early Rose	1861
EU336	EU-0723	Early Wermont	1866
EU338	EU-0864	Flourball	1895
EU341	EU-1447	Fluke	1892
EU342	EU-1702	Abundance	1886
EU343	EU-1723	Paterson Victoria	1863
EU344	EU-1756	President	1896

Código laboratorio	Código colección	Nombre cultivar	año creación
EU346	EU-2032	Champion	1876
EU348	EU-2117	White Rose	1871
EU349	EU-2150	Fortyfold	1836