



# UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS

ESCUELA DE POSTGRADO

**DETECCIÓN DE MUTANTES ESPONTÁNEOS EN CULTIVARES DE  
ARÁNDANO (*Vaccinium corymbosum* L.) MEDIANTE MARCADORES  
MOLECULARES DE MICROSATÉLITES.**

Tesis para optar al Grado de Magíster en Ciencias Agropecuarias

**HÉLDER ARMANDO MITECA**

Directores de Tesis  
María Loreto Prat del Río  
Patricio Hinrichsen Ramírez

Profesor consejero  
Carlos Muñoz Schick  
Alan Zamorano

SANTIAGO - CHILE

2021

**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS**  
**ESCUELA DE POSTGRADO**

DETECCIÓN DE MUTANTES ESPONTÁNEOS EN CULTIVARES DE ARÁNDANO  
(*Vaccinium corymbosum* L.) MEDIANTE MARCADORES MOLECULARES TIPO  
MICROSATELITES.

Tesis para optar al Grado de Magíster en Ciencias Agropecuarias

**Hélder Armando Miteca**

Calificaciones

DIRECTOR DE TESIS

María Loreto Prat del Río.  
Ingeniera Agrónoma, M.S., Dra.

Patricio Hinrichsen Ramírez  
Bioquímico, Dr.

PROFESOR CONSEJERO

Carlos Muñoz Schick  
Ingeniero Agrónomo, M.S., PhD.

Alan Zamorano  
Bioquímico, Dr.

SANTIAGO – CHILE

2021

## AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIA

En primero lugar agradezco al Señor Jesucristo por el don de la vida; a la Agencia Chilena de Cooperación Internacional para el Desarrollo (AGCID) por apoyarme con la beca de los estudios y el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de INIA-La Platina que fue el lugar donde tuve la oportunidad para desarrollar la presente tesis con las sabias orientaciones prácticas de María Herminia Castro.

A mi esposa Elisa, a mi hijo Orman, a mis padres Armando Miteca y Juliana Lenço, hermanos y hermanas por su paciencia en tolerar las ausencias y contención durante las fechas duras que viví en mis estudios y lejos de la amable familia.

A mis directores de tesis, el profesor Patricio Hinrichsen y la profesora María Loreto Prat del Río, por darme la oportunidad de trabajar con ellos, por su buena disposición y acogida en todas las fechas, por darme siempre una oportunidad y la puerta abierta para orientarme, responder mis dudas, incentivar me a realizar un buen trabajo bajo las adversidades antes y después de la presión de la pandemia del Coronavirus.

A mis profesores del Programa del Magister en Ciencias Agropecuarias por enseñarme e instruirme, guiarme durante los ramos y cursos del programa.

A Marco Meneses Montiel, por su paciencia en asesorarme en los análisis genéticos y por estar siempre presente para resolver mis dudas e inquietudes, enseñándome todo el tiempo que necesité, gracias por sus consejos, amistad y enorme apoyo compartido.

A Carlos Castañeda, por sus revisiones y apoyo brindado, mejorando así la calidad de la escritura de mi español.

A la señora Jeannette por orientarme y permitir que mi inserción y adaptación en la Facultad y en Chile fuese más blanda con el foco en los estudios.

Al Director Regional Dr. António Chamuene del Instituto de Investigación Agraria de Moçambique por la confianza, autorización, los consejos y apoyos siempre presentes.

A los profesores Dieter Savaio y Ángela Manjichi del Instituto Superior Politécnico de Manica por la carta de referencia académica para postular la Beca-Nelson Mandela.

En fin, a todos los compañeros del magister, en especial a los patriotas egresados el año 2019 de los distintos programas de magister en Chile: Boaventura, Benicio, Chaneta, Cesario, Cassamo, Celsa, Dinoclaudio, Euginol, Ismael, José, Leonora, Munir, Nilda, Rafael, Raúl, Rogerio, Teodosio.

*“Jesucristo es el mismo ayer, y hoy, y por los siglos”  
(Hebreos 13:8)*

## ÍNDICE

RESUMEN .....	5
ABSTRACT .....	6
INTRODUCCIÓN .....	7
HIPÓTESIS .....	10
OBJETIVOS .....	10
Objetivo General.....	10
Objetivos Específicos.....	10
MATERIALES Y MÉTODOS .....	11
Fuente de material vegetal (biológico) .....	11
Extracción de ADN de hojas arándano .....	11
Amplificación de microsatélites por PCR.....	11
Electroforesis en gel de poliacrilamida.....	12
Tinción con nitrato de plata y revelación.....	13
Análisis Estadístico de los datos.....	13
Anotación de alelos de microsatélites (SSR) .....	13
Distancias genéticas y árboles fenéticos .....	14
RESULTADOS.....	15
DISCUSIÓN .....	23
CONCLUSIONES .....	27
LITERATURA CITADA .....	28
ANEXOS .....	30

### **Índice de Cuadros**

Cuadro 1: Ciclo térmico en la reacción de PCR .....	12
Cuadro 2: Marcadores seleccionados para el estudio.....	12
Cuadro 3: Genotipos estudiados y patrón para cada uno de los tres marcadores SSR consideradas en el presente estudio.....	15
Cuadro 4: Estadígrafos para los tres marcadores SSR aplicados a las variedades de arándanos consideradas en el presente estudio .....	19
Cuadro 5: Genotipos con mutación confirmada mediante tres marcadores SSR .....	20

### **Índice de Figuras**

Figura 1: Electroforesis en gel de poliacrilamida para nueve muestras de <i>Vaccinium corymbosum</i> L. ....	20
Figura 2: Electroforesis en gel de poliacrilamida con los tres marcadores usando 14 muestras de <i>Vaccinium corymbosum</i> L. ....	21
Figura 3: Dendrograma generado por el análisis de conglomerados de UPGMA a partir de la matriz de similitud obtenida por la distancia euclídea .....	22

## RESUMEN

El cultivo del arándano (*Vaccinium corymbosum* L.) en Chile ha crecido notablemente en los últimos años, lo que ha llevado al país a ser el mayor exportador de arándano el hemisferio sur. Muchas de las variedades cultivadas fueron introducidas en la década del 80, habiéndose reportado mutaciones espontáneas en diversos genotipos y habiendo muy pocos o ningún estudio sobre este fenómeno. En este trabajo se presenta la caracterización de mutaciones espontáneas en algunos de los cultivares de arándano más comúnmente cultivados en Chile. Para este propósito, primeramente, se usó un conjunto de 12 marcadores de microsatélites (SSR) para analizar la diversidad genética de plantas de arándano propagadas en huertos y viveros de Chile. De esos 12 marcadores inicialmente ensayados, tres (CA-344, CA-421 y NA-1040) resultaron adecuados para el presente estudio debido a su alta capacidad de diferenciación de variedades con un alto contenido de información polimórfica (promedio de 0,878) y los valores de heterocigosidad observada y esperada promedio de ( $H_o$  y  $H_e$ ) de 0,890 y 0,886 respectivamente, evaluada sobre un total de 143 variedades y líneas de arándano. Con estos tres marcadores SSR se identificaron 14 genotipos que presentaron algún tipo de variación en sus patrones alélicos, es decir cerca de 10% de frecuencia, lo que se considera muy alta. Solo se identificaron cambios de un alelo, que correspondieron ya sea a pérdida o ganancia de un alelo o bien un cambio de su tamaño. El marcador CA-421 presentó la mayor frecuencia de mutaciones, correspondientes a los 12 genotipos (87%) del total. Este trabajo corresponde al primer reporte de variaciones alélicas en los patrones genéticos de SSR de cultivares de arándano. Estos cambios del genoma pueden o no ir acompañados de cambios de una o más características agro-morfológicas, tales como rendimiento, calidad de la fruta, época de cosecha, arquitectura de la planta, etc. Considerando estos resultados, en etapas posteriores, se debería caracterizar con precisión las mutaciones de cada locus SSR, secuenciando los fragmentos amplificados de tamaño variable para confirmar las mutaciones detectadas.

**Palabras clave:** arándanos, microsatélites, SSR, alelos, mutaciones, *Vaccinium corymbosum* L.

## ABSTRACT

The cultivation of blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) in Chile has grown considerably in recent years, making the country the largest exporter of blueberries in the southern hemisphere. Many of the cultivated varieties were introduced in the 1980s, and spontaneous mutations have been reported in several genotypes and there have been little or no studies on this phenomenon. In this thesis we present the characterization of spontaneous mutations in some of the most cultivated blueberry cultivars in Chile. For this purpose, first, a set of 12 microsatellite markers (SSR) was used to analyse the genetic diversity of blueberry plants propagated in orchards and nurseries in Chile. Of these 12 markers initially tested, three (CA-344, CA-421 and NA-1040) were suitable for the present study due to their high varietal differentiation capacity with a high polymorphic information content (average of 0.878) and average observed and expected heterozygosity values ( $H_o$  and  $H_e$ ) of 0.890 and 0.886 respectively, evaluated on a total of 143 blueberry varieties and lines. With these three SSR markers, 14 genotypes were identified that showed some variation in their allelic patterns, about 10% frequency, which is considered very high. Only one allele change was identified, which corresponded to either loss or gain of an allele or a change in allele size. The CA-421 marker had the highest frequency of mutations, corresponding to 12 genotypes (87%) of the total. This work corresponds to the first report of allelic variations in the SSR genetic patterns of blueberry cultivars. These genome changes may or may not be accompanied by changes in one or more agro-morphological traits, such as yield, fruit quality, harvest time, plant architecture, etc. Considering these results, in subsequent steps, the mutations of each SSR locus should be accurately characterized by sequencing the amplified fragments of variable size to confirm the detected mutations.

Keywords: blueberries, microsatellites, SSR, alleles, mutations, *Vaccinium corymbosum* L.

## INTRODUCCIÓN

El arándano pertenece al género *Vaccinium* de la familia Ericaceae, subfamilia *Vaccinioideae*, que posee 36 secciones y alcanza 450 especies (Rubio *et al.*, 2018), entre las cuales pueden encontrarse especies diploides, tetraploides y hexaploides (Muñoz, 1980). *Vaccinium corymbosum* L., es una especie de arándano que presenta baja altura, con frutos esféricos de coloración variada, desde azul claro hasta azul negro, con un calibre entre 0,7 y 1,5 cm, rico en vitamina C y con bajo contenido de calorías, alto grado de fibra, nutrientes y propiedades antioxidantes que son atributos que la identifican como una fruta saludable (Hortifrut, 2019; Ormazábal *et al.*, 2020).

La rápida expansión del cultivo está asociada a una alta demanda de los consumidores y el desarrollo de programas de mejoramiento genético y la consecuente obtención de nuevos cultivares, adaptado a un amplio rango de necesidades de horas frío para romper el receso invernal, permitiendo su cultivo en casi todo el mundo, incluyendo países de los cinco continentes, tanto en climas templados como en climas tropicales (Rubio *et al.*, 2018).

En Chile el cultivo fue introducido en la década de 1980 (Hinrichsen *et al.*, 2009) y desde esa época ha mostrado un importante aumento en la superficie plantada, llegando a ocupar en la actualidad alrededor de 19.000 ha con una producción que bordea las 100.000 toneladas anuales (INIA, 2017; Fedefruta, 2018; Ormazábal *et al.*, 2020). Asimismo, su consumo y tendencia de altos precios de comercialización a nivel mundial ha crecido alrededor del 14% en los últimos años (Hortifrut, 2019).

Actualmente, Chile es el principal exportador de arándanos del Hemisferio Sur (Ormazábal *et al.*, 2020), debido a una buena adaptación del cultivo a las variadas y excelentes condiciones agroclimáticas, favoreciendo su crecimiento y obteniendo los mayores rendimientos junto con una excelente calidad de la fruta (INIA, 2017).

Uno de los factores que influyeron en la rápida expansión del cultivo, fue el hecho que la mayor parte de los cultivares introducidos a Chile desde el inicio del cultivo en los años 80, fueron introducidos a partir de material propagado mediante cultivo de tejidos *in vitro* (micropropagado). Esto determinó que, mayoritariamente, las plantas introducidas al país estuvieran libres de las plagas y enfermedades presentes en su lugar de origen. Adicionalmente, con el tiempo, las plantas se comenzaron a propagar en Chile y un número significativo de viveros comenzó a utilizar la micropropagación como la forma habitual de propagación de esta especie. Muchas de los cultivares plantado en Chile tienen 30 o más años de uso y como ya se ha señalado, han sido mayoritariamente provenientes de micropropagación.

En los últimos años, se ha observado un aumento significativo de la presencia de plantas fuera de tipo, lo que se manifiesta en diversos aspectos tanto de la morfología como de la fisiología de las plantas. Estos cambios han sido atribuidos a la expresión de mutaciones

espontaneas, ocurridas durante el proceso de propagación de las plantas (Hinrichsen, 2016).

El término mutación fue introducido por el botánico holandés Hugo de Vries en 1901, definiéndolo como “variaciones hereditarias discontinuas que provocan cambios amplios en los seres vivos y que no son fácilmente reconocibles” (Oliveira *et al.*, 2014). Las mutaciones pueden ser inducidas o espontáneas (Lamo *et al.*, 2017). Las mutaciones que surgen espontáneamente son muy raras y aleatorias en cuanto al momento en que se producen y al gen que afectan (Lamo *et al.*, 2017). Pero las mutaciones están en la base de la evolución de los seres vivos y si bien son bienvenidas en el ámbito del mejoramiento genético, porque aumentan la variabilidad dentro de una especie, en el ámbito de la propagación de plantas, son indeseables (Jimenez, 2011).

Por otra parte, ocasionalmente, algunos cultivares pueden presentar fenotipos mutados que afectan una porción de la planta, a veces extendiéndose a ramas enteras, que adquieren características diferentes (Nayar *et al.*, 1997). Cuando estas ramas (brotes o *sports*) se propagan vegetativamente mediante técnicas clonales y el nuevo fenotipo se mantiene, pueden dar lugar a un nuevo cultivar, a menudo exhibiendo sólo un carácter fenotípico diferente de la planta que la originó (Penna y Jain, 2017).

Se han reportado mutaciones espontáneas en diversas especies de plantas cultivadas, incluyendo cultivos anuales, frutales y ornamentales, tales como cebada, trigo, berenjena, sandía, papa, haba, col, almendro, banano, vid, naranjo, piña, nogal, arveja, mango, pomelo, peral, mandarino y papayo (Singh *et al.*, 2011; Mba, 2013 ; Lamo *et al.*, 2017).

Las principales características asociadas en las mutaciones espontaneas identificadas en cítricos por ejemplo, están relacionados con el vigor, la época de cosecha, la coloración interna y externa del fruto, el número de semillas, el contenido de azúcar y contenido de ácidos orgánicos de la pulpa (Oliveira *et al.*, 2014).

En la gran mayoría de los casos las mutaciones son indeseables, afectando la uniformidad y características con valor agronómico y económico (Oliveira *et al.*, 2014). Por ejemplo, en el plátano (*Musa spp.*) se describen mutaciones no deseables ya que ocurren frecuentemente durante la propagación clonal en la cual interesa mantener la estabilidad del material (Singh *et al.*, 2011; Mba, 2013 ; Lamo *et al.*, 2017).

En las plantas micropropagadas, la aparición de mutantes es un fenómeno de común ocurrencia, originadas por lo que se ha dado en llamar variación somaclonal (Bairu *et al.*, 2011). Por lo tanto, el origen de la variación en cultivo *in vitro* tiene las causas genéticas y no genéticas (Zhenghua y Ahuja, 1993). Así, los factores más relevantes que influyen en las variaciones somaclonales en cultivo *in vitro* son por ejemplo las “heridas” de los tallos, la esterilización de explantes, el desequilibrio de los componentes de los medios como las fuentes de las fitohormonas utilizadas, la fuente de azúcar, la iluminación y la humedad (Bidabadi y Jain, 2020).

Sin embargo, a nivel molecular, el fenómeno de variación somaclonal ocurre por diferentes causas como metilación del ADN, mutaciones puntuales, alteración por ejemplo del número de copias de segmentos de ADN, rearrreglos y recombinaciones cromosómicas y ocurrencia de elementos transponibles (Jelenić *et al.*, 2001).

Por otro lado, en las plantas micropropagadas manifiestan otro tipo de cambios heredables en la expresión y función génica que no pueden ser explicados por cambios en la secuencia de ADN llamados por variaciones epigenéticas (Richards, 2006). Todavía, las variaciones epigenéticas podrían estar asociadas fundamentalmente por el ambiente donde un mismo genotipo puede comportarse con distintos fenotipos alternativos lo que podría estar influenciado por los factores como: modificación de histonas (acetilación y metilación), metilación de citosinas, y micro y pequeños ARNs de interferencia (Masuelli y Marfil, 2011).

La información sobre estudios de mutaciones en arándanos es escasa. Las mutaciones se pueden detectar con análisis moleculares (Martínez *et al.*, 2007). Estas herramientas moleculares se han usado para la caracterización genética de arándano. Por ejemplo, se ha usado la amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPD) y marcadores de microsatélites (SSRs) para la confección de un mapa genético de *Vaccinium darrowi*; el estudio de similitud genética de cultivares de *Vaccinium ashei*; caracterización de cultivares de *Vaccinium corymbosum*, *Vaccinium ashei* y *Vaccinium darrowi* (Boches *et al.*, 2005; Martínez *et al.*, 2007; Sanchez-Chiang & Jimenez, 2009; Hinrichsen *et al.*, 2009 ; Hinrichsen, 2016).

Otro estudio recurrió a marcadores RAPD para caracterizar un genotipo fuera de tipo observado en O'Neal, el cual presentó un patrón de bandas claramente diferente al de las muestras de referencia (Martínez *et al.*, 2007). Al respecto, aún no existen estudios de mutaciones espontáneas en arándanos utilizando marcadores moleculares de tipo microsatélites o SSRs. En Chile, se ha descrito la existencia de variantes fenotípicas (planta fuera de tipo) en campo y en viveros, teniendo resultados preliminares que indican la existencia de variaciones alélicas en marcadores de tipo SSR (Hinrichsen y Castro, resultados no publicados). La aparición de variantes aberrantes se presenta en clones multiplicados en viveros y huertos, pudiendo manifestarse como pérdidas en la uniformidad de la cosecha, alteración del número de flores, cambio del color y tamaño de frutos, entre otros, afectando así el desempeño de toda la cadena productiva del arándano.

## **HIPÓTESIS**

Se sabe que los métodos de propagación vegetativa, efectuada tanto *in vitro* como por métodos tradicionales, pueden incrementar la tasa normal de mutaciones presentes en una determinada especie. En arándano (*Vaccinium corymbosum* L.), un frutal mayoritariamente micropropagado, esto se puede documentar con el uso de marcadores microsatélites (SSR) estudiando los cultivares más comunes y de más larga data presentes en Chile.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo General**

Evaluar la ocurrencia de mutaciones espontáneas en genotipos de arándano (*Vaccinium corymbosum* L.) más comúnmente propagados en Chile a través de marcadores moleculares microsatélites (SSR).

### **Objetivos Específicos**

1. Determinar los patrones genéticos de cultivares de arándanos presentes en Chile basados en marcadores SSR;
2. Detectar variantes alélicas (mutaciones) de los patrones genéticos de cultivares de arándanos;
3. Analizar la diversidad genética intra-varietal y determinar la frecuencia de las mutaciones de los genotipos en estudio.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Fuente de material vegetal (biológico)

Se utilizaron hojas y brotes jóvenes de 143 genotipos de arándano cosechados en 20 viveros (Anexo 1) de la región central y sur de Chile. Posteriormente, estas muestras fueron transportadas en condiciones de refrigeración al Laboratorio de Biotecnología del Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA) – La Platina, donde se almacenaron a -70°C. Luego fueron procesados para extraer y purificar su ADN.

### Extracción de ADN de hojas arándano

Para la extracción de ADN se utilizó el protocolo descrito por Lodhi *et al.* (1994), adaptado por Hinrichsen *et al.* (2009). Se utilizó 0,1 g de tejido foliar (de hojas o brotes) aproximadamente. La molienda se hizo en un mortero con nitrógeno líquido, de la siguiente manera: se puso el tejido vegetal, se agregó nitrógeno líquido y se molió rápidamente con un pistilo, donde se adicionó 700µL de tampón de extracción y se homogenizó por tres minutos. Seguidamente, se incubó a 60°C por 25 minutos y se enfrió a temperatura ambiente. Posteriormente, se adicionaron 600µL de una mezcla de cloroformo-alcohol isoamílico y se mezcló suavemente por inversión. Se centrifugó a 8000 rpm por 15 minutos. A continuación, se transfirió el sobrenadante a otro tubo, midiendo el volumen (450 µL), luego se adicionó ½ volumen de NaCl 5 M (225µL). Posteriormente, se adicionaron dos volúmenes de etanol puro (900µL), se mezcló y se dejó en reposo por 30 minutos o más tiempo a 4°C o a temperatura ambiente. Después se centrifugó a 6000 rpm por seis minutos y se descartó el sobrenadante. Se agregó etanol 76% (500µL), se centrifugó a 6000 rpm por cinco minutos y se descartó el sobrenadante. Finalmente, se secó el *pellet* a temperatura ambiente o en placa caliente. El precipitado después de secado se resuspendió en 100µl de solución de RNAsa (0,1mg/µL en agua destilada estéril) y se incubó a 37°C por 15 minutos a baño maría. El ADN se guardó a 4°C cuando se utilizó en plazo breve o a -20°C para almacenamiento a largo plazo.

### Amplificación de microsatélites por PCR

La mezcla de reacción (16µl) contenía 3 µl de ADN, 1,2 µl de tampón PCR 10X, 0,36µL de MgCl<sub>2</sub> 50 mM, 0,6µl solución de dNTPs 10 mM (2,5 mM cada uno), 5 pmoles/µL (mix) de cada partidor (directo e inverso), 0,5U de ADN polimerasa Taq y 5,9µL de agua destilada estéril. En el presente estudio fueron seleccionados 12 marcadores (Cuadro 2) basados en los estudios de Boches *et al.* (2005). La reacción de amplificación se realizó en termocicladores con el siguiente ciclo térmico (Cuadro 1):

**Cuadro 1:** Ciclo térmico en la reacción de PCR

Fases	Temperatura (°C)	Tempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95	5 minutos	} 35
Desnaturalización	94	30 segundos	
Alineación	56	30 segundos	
Extensión	72	30 segundos	
Extensión final	72	5 minutos	

**Cuadro 2:** Marcadores seleccionados para el estudio

Nº	Marcador	Sequence (Forward) 5'	Sequence (Reverse) 3'	Tª (°C)	Tamaño esperado (bp)
1	CA-344	TTACCAAAACGCCTCTCCAC	GTTTCTTCCTTACGCCCTGAAAT	60	164
2	CA-421	TCAAATTCAAAGCTCAAAATCAA	GTTTAAGGATGATCCCGAAGCTCT	60	201
3	CA-794	CGGTTGTCCCACTTCATCTT	GTTTGAAITGGCTTCGATTC	60	227
4	CA855	CGCGTGAAAAACGACCTAAT	GTTTACTCGATCCCTCCACCTG	64	253
5	NA1040	GCAACTCCCAGACTTTCTCC	GTTTAGTCAGCAGGGTGCACAA	60	194
6	NA41	TTCCTTTAGTCGCGTCATCA	GTTTAAGGTCGCTACGAGACTCCA	62	203
7	NA741	GCCGTCGCCTAGTTGTTG	GTTTGATTTGGGGTTAAGTTTGC	58	248
8	VCC1-I2	AGGCGTTTTTGAGGCTAACA	TAAAAGTTCGGCTCGTTTGC	62	220
9	VCC1-J5	CCCCAACGGTCTTGATCTTA	GTTTCTCTCTCCAACCCAGT	54	275
10	VCC1-K4	CCTCCACCCACTTTCATTA	GCACACAGGTCCAGTTTTTGT	62	234
11	VCC-H9	TCCGAGCCATTTAGTGTCAA	GTTTACAAAAACAAAAGCCATGC	62	211
12	VCC-J9	GCGAAGAACTCCGTCAAAA	GTGAGGGCACAAAGCTCTC	62	173

Fuente: (Boches *et al.*, 2005 ; Hinrichsen *et al.*, 2009)

### Electroforesis en gel de poliacrilamida

Dos vidrios de 35x45cm se utilizaron para preparar el gel que se lavaron con agua corriente y etanol, cubriendo uno con 600 µL de Repel-silano ES y el otro enjuagándolo con una mezcla de 1 ml de etanol, 5µL de ácido acético al 10% y 5µL de Silano A-174. Después de tratados y secos los vidrios, se enfrentaron cara a cara con un sistema de separadores y apretadores fijados a los lados, además se colocó bien ajustada una peineta de dientes de tiburón invertida. A continuación, en un vaso se preparó mezclando el gel de poliacrilamida con los siguientes reactivos: 65 ml de solución de acrilamida-urea al 6%, 180µL de APS al 10% y 95 µL de TEMED para polimerizar. Rápidamente, se efectuó el llenado con una jeringa y se dejó polimerizar a temperatura ambiente durante 30-60 minutos. A continuación, se tomaron los vidrios polimerizados y se montaron en una cámara de electroforesis vertical, donde se retiró el peine y luego se colocó el buffer TBE 0,5X en los soportes y se corrió la electroforesis durante 2 horas con una potencia de 90 W, 50 mA, con una temperatura constante de 50°C. Antes de cargar las muestras, el gel fue precalentado a 50°C durante 5 minutos aproximadamente. El producto de PCR se desnaturalizó agregándole un volumen de tampón de carga (formamida 95%, xilen-cianol 1 mg/ml y EDTA 10mM pH 8,0), calentándola durante 10 minutos a 95°C y se colocó de inmediato en hielo. Luego se cargaron 2,5 µL de cada muestra en cada pocillo.

### Tinción con nitrato de plata y revelación

Con la corrida de electroforesis finalizada, los fragmentos de ADN amplificados y separados se tiñeron con nitrato de plata siguiendo los procedimientos publicados por Hinrichsen *et al.* (2009). Para ello, el vidrio que lleva adherido el gel de poliacrilamida se incubó en 2 litros de ácido nítrico diluido durante 10 minutos. A continuación, se lavó con agua destilada por 1 minuto y en seguida el vidrio se incubó durante 20 minutos en 2 litros de solución de nitrato de plata 1 g/l que contenía 3 ml de formaldehído; luego se reveló con 1 litro de solución de carbonato de sodio (36 g/l con un cristal de tiosulfato de sodio y 600 $\mu$ L de formaldehído). Se agitó levemente y el revelado se prolongó con movimientos suaves durante 3 minutos, agregándolo luego en una solución de ácido acético durante 5 minutos, reemplazándola finalmente por agua destilada. Los tiempos de incubación se ajustaron hasta que las bandas de ADN se contrastaron con relación al fondo y se obtuvieron resultados reproducibles.

Posteriormente, los fragmentos teñidos en gel de poliacrilamida se visualizaron utilizando un transiluminador. El tamaño de los alelos de microsatélites se determinó con apoyo de muestras patrones de ADN de tamaño conocido en la base de datos existente en el laboratorio de biotecnología de INIA-La Platina. Por otra parte, cuando la diferencia en el tamaño de los alelos entre un marcador y otro fue de más de 50 pb, se realizaron cargas múltiples de hasta tres marcadores en una misma electroforesis en forma secuencial, cada 30 minutos aproximadamente cada una. Finalmente, los geles se escanearon recurriendo a un *scanner* EPSON V370P para posteriormente realizar la lectura y el análisis correspondiente.

### Análisis Estadístico de los datos Anotación de alelos de microsatélites (SSR)

Los análisis de microsatélites provenientes de geles de poliacrilamida se analizaron visualmente y se elaboró una matriz de presencia/ausencia (planilla Excel). Los patrones obtenidos fueron utilizados para determinar los distintos genotipos y se calculó la frecuencia alélica y genotípica. Se evaluaron los siguientes parámetros genéticos:

Heterocigosidad esperada ( $H_e$ ) calculada de acuerdo con (Meirmans *et al.*, 2018) para individuos tetraploides, pues la estimación  $H_e$  es como una estimación de la diversidad genética no como se fuese la heterocigosidad *per se*:

$$H_e = 1 - \sum p_i^k$$

Dónde:  $H_e$  = Heterocigosidad esperada,  $p_i$  = frecuencia del alelo  $i$  para el locus estudiado y  $k$  = número de la ploidia que tiene el individuo en estudio.

Heterocigosidad observada ( $H_o$ ) se calculó según (Hardy, 2016) es decir para para estimar la  $H_o$  es necesario definir en base al genotipo la frecuencia de gametos

heterocigotos que podrían producirse en base al individuo; en otra palabras se propone utilizar la “heterocigosidad gamética” lo que se calculó con la siguiente formula:

$$H_o = \frac{\text{Individuos heterocigotos}}{\text{número total de individuos analizados}}$$

Para alelos efectivos se calculó de acuerdo con la siguiente formula:

$$[A_e = 1/(1-He)]$$

Dónde:  $A_e$  = alelos efectivos,  $He$  = Heterocigosidad esperada

Índice de Contenido Polimórfico (PIC por su siglas en inglés) que determina cuán informativo en términos de polimorfismo es un marcador en la población según a las frecuencias de los alelos (Cadima *et al.*, 2013), se calculó a partir de la siguiente fórmula:

$$\text{PIC} = 1 - \sum p_i^2 - \sum \sum 2p_i p_j^2$$

Dónde:  $p_i$  = frecuencia del alelo  $i$  para el locus estudiado  $p_j$  = frecuencia del alelo  $(i+1)$

### Distancias genéticas y árboles fenéticos

Los cálculos de similitud genética entre cada par de datos se realizarán con los coeficientes de similitud de Jaccard (Johns *et al.*, 1997), definidos de la siguiente manera:

$$J_{ij} = a / (a+b+c) \text{ y}$$

$$D_{ij} = 2a / (2a + b + c), \text{ donde}$$

$i$  y  $j$  = genotipos

$a$  = bandas presentes en ambos genotipos  $i$  y  $j$

$b$  = bandas presentes sólo en el genotipo  $i$

$c$  = bandas presentes sólo en el genotipo  $j$

El coeficiente de Jaccard representa el cociente entre las bandas compartidas en ambos genotipos y el número de bandas totales registradas. Las matrices de distancias genéticas obtenidas se utilizarán para la construcción de árboles fenéticos (dendograma de similitud) usando los algoritmos de agrupamiento UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method with Arithmetical Averages*). Los árboles de tipo UPGMA se construirán con la ayuda del programa R (Paradis y Ahumada, 2003).

## RESULTADOS

Una etapa previa a este trabajo consideró analizar un total de 143 variedades y líneas no identificadas de arándanos obtenidos de 20 viveros o huertos distribuidos a lo largo de Chile (Anexo 1). Los resultados de ese trabajo previo se presentan brevemente para contextualizar de mejor manera el trabajo desarrollado en esta tesis. En un comienzo fueron evaluados 12 marcadores microsátélites, sobre una colección más reducida de genotipos (Hinrichsen *et al.*, 2009). De esos 12 marcadores, tres resultaron adecuados para el presente estudio debido a su alta capacidad de diferenciación de variedades. Estos tres SSRs son los que se usan rutinariamente para *fingerprinting* varietal, servicio que se realiza en el laboratorio de biotecnología de INIA La Platina. Estos tres marcadores (Cuadro 3) presentan una capacidad de discriminación entre variedades tal que excede los requerimientos para poder diferenciar los cultivares presentes en Chile y líneas de mejoramiento genético analizados hasta la fecha en este Centro de Investigación.

**Cuadro 3:** Genotipos estudiados y patrón para cada uno de los tres marcadores SSR consideradas en el presente estudio

Nº	Genotipo	CA-344	CA-421	NA-1040
1	Abundance	156-159-162	170-186-192-222	190-192-216
2	Alapaha	150-153-156-159-162	168-170-178-182-192	180-194-196-208-220
3	Aliceblue	153-162	168-172-174-182-188-192	180-196
4	Apolo	147-159-162-165	166-174-180-186	182-190-192
5	Aurora	156-159-168	170-180-182	190-192-256
6	Beckyblue	153-156-162	168-172-188-190-212	180-184-190-206-220
7	Bella	153-156	170-182-190-192	182-192-200-216
8	Berkeley	156-159-162-165	186-190-192-198	186-192-208-216
9	Biloxi	147-153-159-168	170-182-192-224	192-216
10	Bliss	147-156-159-162	166-168-222	184-192-196
11	Blue Crisp	147-156-162	186-192-198-224	186-192-206
12	Bluebelle	147-162	170-182-186-188-190	184-194-208-214-240
13	Bluechip	153-156-162	166-182-190-192	184-192-200-210
14	Bluecrop	153-156-162-168	166-170-182-198	184-192-210-216
15	Bluecrop B1P1	153-156-162-168	170-182-198	184-192-210-216
16	Bluehaven	153-156-162-165	180-182-190-198	188-190-192-216
17	Bluejay	162-165-174	186-192-198	184-196-208-216
18	Blueray	153-156	166-170-180-198	184-188-216-256
19	Bluetta	156-162-165	166-180-184-222	184-186-192
20	Bobolink	147-156-162	172-186-192-222	186-188-218-228
21	Bonita	153-156-165	166-168-172-188-190-198	180-184-190-204
22	Brigitta	153-156-165-168	166-170-180-198	188-190-192
23	Brigitta	153-156-165-168	166-170-180-200	188-190-192-256
24	Brigitta	153-156-165-168	166-170-180-198	188-190-192-256
25	Brigitta LD2	153-156-165-168	166-170-180-194	188-190-192-256
26	Brighthwell	153-156-159-162	170-180-(190)-192	180-196-208-220
27	Brighthwell	156-159	170-180-182-190-192	180-196-208-220
28	Camellia	147-156-165-168	166-186-192	182-192
29	Cape fear	156-159-162	166-170-182-198	182-190-192-210

**Cuadro 3:** Genotipos estudiados y patrón para cada uno de los tres marcadores SSR consideradas en el presente estudio (Continuación)

Nº	Genotipo	CA-344	CA-421	NA-1040
30	Centurion	147-150-153-159-162	168-170-174-178-182	180-194-220-240-252
31	Choice	147-156-162	182-190-192-198-202	180-182-204-208-216
32	Climax	162-165	168-170-180-190-198	184-204-220-240
33	Clockwork	156-162	166-170-182-206	182-184-192
34	Collins	153-156-165	166-190-192-210	188-192-200-208
35	Corona	147-159-162	168-186-192-198	182-188-192-216
36	Corona	147-159-162	168-186-192	182-188-192-216
37	Coville	153-156-165-168	166-182-190-198	184-192-216-256
38	Darrow	156-162	176-190-192-198	190-192-196
39	Daybreak	147-153-162	182-190-224	190-192-224-232
40	Draper	153-156-165	166-186-198-206	184-188-196
41	Draper	153-156-165	166-186-198-208	184-188-196
42	Draper	ND	166-186-198-202	ND
43	Duke	156-162-165	166-186	184-186-188-192
44	Duke	156-162	166-186-198	184-186-188-192
45	Duke	156-162-165	166-182-186-198	184-186-188-192
46	Earliblue	156-162-165	166-192-198-222	184-188-192
47	Elliot	153-156-159-162	182-190	188-192-256
48	Elliot	153-156-159-(162)	182-190-192	188-192-256
49	Emerald	153-156-159-168	170-186	182-184-192-210
50	Farthing	147-156-159-168	162-186-192-198	182-188-192
51	Farthing	147-156-159-168	162-186-192-200	182-188-192
52	Georgiagem	156-159-162	170-192-198	182-184-188-210
53	Herbert	153-156-159-165	166-182-186-190	184-192-216
54	Jersey	156-162-168	176-182-186-198	192-196-216
55	Jewel	147-159-165	168-172-186-222	182-192
56	Julia	156-159-168	182-192-198	192-200-216
57	Julieta	147-156-165	186-190-192-198	192-210
58	Julieta	147-156-165	186-190-192-?	192-210
59	Keppsake	147-162-165	166-198-224	210-216
60	Kestrel	156-165-168	190-192-198	188-206-216-228
61	Last Call	156-159-162	170-182-190	188-192-216
62	Legacy	156-159-162-168	168-182-190-192	182-190-196-210
63	Liberty	153-156-159-165	170-182-198	188-190-192
64	Magnífica	156-159-168	190-192-196-198	190-192-216
65	Marimba	153-156-162	186-198-222	186-192-206-216
66	Meadowlark	147-156-168	180-182-186-198	182-200-216
67	Millenia	153-156-168	170-186	184-200-210-216
68	Misty	153-156-162-165	186-196-198-222	186-208-216-234
69	Nelson	153-156-162	180-182-190-198	184-186-192-216
70	O' Neal	156-159-162	166-198-222	188-190-192-228

ND= no determinado

**Cuadro 3:** Genotipos estudiados y patrón para cada uno de los tres marcadores SSR consideradas en el presente estudio (Continuación)

Nº	Genotipo	CA-344	CA-421	NA-1040
71	Marimba	153-156-162	186-198-222	186-192-206-216
72	Meadowlark	147-156-168	180-182-186-198	182-200-216
73	Millenia	153-156-168	170-186	184-200-210-216
74	Misty	153-156-162-165	186-196-198-222	186-208-216-234
75	Nelson	153-156-162	180-182-190-198	184-186-192-216
76	O' Neal	156-159-162	166-198-222	188-190-192-228
77	Ochlocone	147-153-156-165	170-180-182-188-192	180-182-196-208-220
78	Osorno	156-162-165-168	182-186-190-206	184-190
79	Ozarkblue	159-162-168	166-170-182-192	192-210-216-256
80	Palmetto	159-162-165	166-180-192-220	182-192-216
81	Patriot	156-162	166-182-192-198	184-190-192
82	Powerblue	147-156	180-182-190-192-212	180-196-208
83	Premier	147-156-162	168-184-188-198-212	180-182-194-208-220
84	Presto	147-153-159-162	166-198-222	190-206-210-228
85	Primadonna	159-162	166-172-198-204	192-206-228
86	Primobblue	147-153-156-159	166-168-186-198	182-184-192-196
87	Raven	147-156-159-168	196-198-222	190-208-216-228
88	Reveille	156-168	184-192-198-222	184-192-206-228
89	Rocío	159-168	168-192-198-224	188-190-192-194
90	Rocío	159-168	168-192-198-214	188-190-192-194
91	Santa Fe	153-156-159-168	170-172-186-192	188-192-206-216
92	Sapphire	147-162	186-190-192-224	190-192-208-216
93	Scintilla	153-159-168	162-186-198	192-228-234
94	Sensation	156-159	180-182	186-188-192
95	Sierra	156-162-165	166-170-190-194	184-188-192-256
96	Sierra	156-162-165	166-170-190	184-188-192-256
97	Snowchaser	147-153-159-165	166-198	206-210-216-228
98	Southland	147-153-156	174-182-186-188-192-198	180-184-196-240
99	Southmoon	156-159-168	186-192	182-192-216-236
100	Spartan	156-162-168	166-180-198	184-192-216
101	Springhigh	153-156-168	182-186-192	182-190-192-234
102	Star	153-156-159-162	166-190-196-198	186-190-228-256
103	Stella	159-162-165	168-186-218-224	192-216
104	Sunrise	156-159-162	178-180-184-192	188-192-202
105	Suzieblue	153-159-165	166-190-192-210	182-184-190-228
106	Temptation	147-156-159-165	172-186-206-224	188-192-196
107	Tiff Blue	147-153-156-165	182-190-192-198-216	180-182-196-208-214
108	Toro	156-159-162-168	166-186-198	184-192-216
109	Ventura	156-159-168	186-190-192-198	188-190-192
110	Vernon	147-150-159-162	168-174-184-186-192-198	180-190-198-208-220-232
111	Victoria	153-162-168	180-186-224	182-210-216
112	Windsor	147-156-159	192-198-222	188-190-192-228
113	Woodard	147-162	168-174-182-186-192-198	180-204-216

**Cuadro 3:** Genotipos estudiados y patrón para cada uno de los tres marcadores SSR consideradas en el presente estudio (Continuación)

Nº	Genotipo	CA-344	CA-421	NA-1040
114	Zilla	156-159-162	166-190-192-198	188-210-228-256
115	05-65-VC1	156	166-186-198-206	184-190-192-196
116	05-66-CC1	147-156-159-162	166-186-198	186-190-208
117	05-7-VC1	162-165-168	166-186-198	182-190-192-214
118	05-7-VC2	156-162-165	166-186-198	182-192-216
119	62-3	159-162-168	172-190-192	192-206
120	748	159-162-168	190-192-196-198-204	192-228
121	751	156-159	166-172-186-222	182-184-192-216
122	752	147-156-159	182-198-224	192-216-234
123	753	153-159-162	166-168-198-220	186-192-228
124	754	159-162-168	190-192-196-198-204	192-206-228
125	755	147-153-156-159	170-182-222	182-188-192-228
126	759	156-159-162	186-192-198-222	190-192-216-228
127	CV 8-10	147-159-168	170-184-192-198	184-192-228
128	CV 8-11	153-156-162	170-186-198-210	182-188
129	CV 8-16	162-168	170-190-198	192-212
130	CV 8-22	156-159-162-168	166-170-182-186	182-192-226
131	CV 8-35	153-156-162-165	166-180-182	182-206-212-216
132	CV 8-45	147-153-159-162	166-182-186-192	188-192-216-228
133	NN	147-153-156-162	170-186-198-224	182-192-212-228
134	NN1	147-153-156	170-186-198	182-184-190-192
135	NN1D	147-156	186-222	184-192-228
136	NN2	147-159-162	166-170-186-224	192-206-212-228
137	NN3 nn7	153-156-159-168	170-172-204-224	182-192-228
138	NN4 nn6	147-159-162	166-192-198	188-192-216
139	NN5	147-153-156-168	186-198	184-188-190-192
140	NN5D	156-159-162-165	166-170-190	182-210
141	NN6	147-156-168	172-224	192-206
142	NN7	156-159-168	168-170-224	188-192-228
143	NN8	153-159-162	166-170-186-198	192-212-228
144	NN-8	147-159-165	166-182-186-192	182-184-192-214
145	NN9	147-156	186-198	184-188-192
146	NN10	153-156-168	186-190-192-198	188-196-210
147	NN-M3 2007	147-153-159-162	170-174-178-182-186-188	180-184-196-220-240
148	NN M16 2007	153-156-162-168	166-170-182-198-202	184-192-210-216
149	NNCM 2008	153-156-162	182-190-198	186-192-210-216
150	NNCM 2008?	153-156-162	182-190-194-198	186-192-210-216
151	NN-43D	147-156-165-168	170-180-192-222	182-192-210-216
152	NN-65D	153-156	166-186-198	182-188-192
153	NN-70D	147-156-168	166-170-192-198	184-190-192-210
154	NN VS 9	156-159-162	168-178-182-186	180-194-216
155	NN SR1	147-156-165	166-190-192-222	186-192-228
156	VCDC-001	153-162-168	166-170-186-192	182-190-192-216
157	VCCB-002	156-162-165	166-170-190-192	182-210

En el cuadro 4 se presentan los parámetros genéticos evaluados para estos tres marcadores aplicados sobre los 143 genotipos. Se determinó la cantidad absoluta de alelos por marcador que fue de 9 para CA-344, 31 para CA-421 y 30 para NA-1030, lo que va en directa relación a la capacidad discriminante de estos marcadores. De modo equivalente, los alelos efectivos determinados fueron de 6,29; 11,11 y 10,87 para los marcadores CA-344, CA-421 y NA-1030, respectivamente. El rango de tamaño de los alelos de cada marcador fue 147-168 para CA-344, 166-220 en el caso de CA-421 y 180-256 para NA-1040, siendo este último el rango más amplio de tamaños alélico.

Los valores de heterocigosidad promedio ( $H_o$  y  $H_e$ ) fueron similares: 0,890 y 0,886, respectivamente. La heterocigosidad observada, por su parte, en orden creciente, fue de 0,849 para CA-344; 0,898 para NA-1040 y 0,924 en el caso de CA-421. Por otro lado, la heterocigosidad esperada fue de 0,841 para CA-344, 0,908 para el caso de NA-1040 y 0,910 para el marcador CA-421. El contenido de información polimórfica, por otra parte, fue más bien parejo entre estos marcadores, con un rango de entre 0,822 y 0,906, y con un promedio de 0,878.

**Cuadro 4:** Estadígrafos para los tres marcadores SSR aplicados a las variedades de arándanos consideradas en el presente estudio

Marcador SSR	A	Ae	RTA (bp)	$H_o$	$H_e$	PIC
CA-344	9	6,29	147-168	0,849	0,841	0,822
CA-421	31	11,11	166-220	0,924	0,910	0,906
NA-1040	30	10,87	180-256	0,898	0,908	0,905
<b>Promedio</b>			-	0,890	0,886	0,878

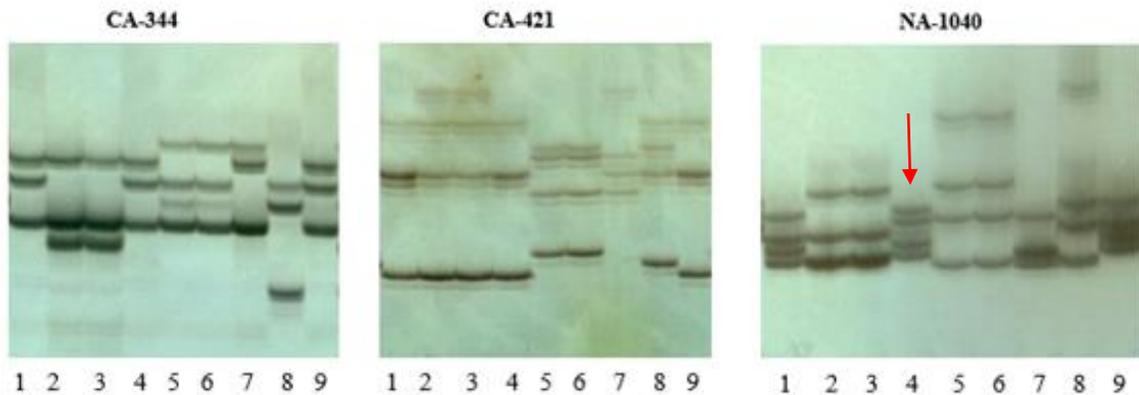
A= alelos absolutos por marcador; Ae = alelos efectivos; RTA= Rango del tamaño de alelo;  $H_o$  = heterocigosidad observada;  $H_e$ = heterocigosidad esperada; PIC = contenido de información polimórfica.

Sobre un total de 143 genotipos analizados se encontraron 14 que presentaron algún tipo de variación en sus patrones alélicos (Cuadro 5), es decir, que no correspondieron exactamente al patrón de la variedad o línea determinada previamente para este genotipo. En general se identificaron solo cambios de un alelo, ya sea que se perdió (o ganó) un alelo (extra), o bien que se verificó un cambio de tamaño. Por ejemplo, en la figura 1 se muestran los patrones de bandas para nueve variedades analizadas con los tres marcadores microsatélites: CA-344, CA-421 y NA-1040. De estas muestras, las que se cargaron en los carriles 1, 4 y 9 fueron identificadas como “Duke”; sin embargo, el segundo alelo de la muestra 4 para el marcador NA-1040 varió de 188 a 190, es decir, el amplicón creció en  $\pm 2$  pb. La presencia de bandas (alelos) diferentes comparado con la muestra de referencia es un indicio de una presumible mutación en la muestra de “Duke” estudiada. Otro ejemplo se puede observar en la figura 2, donde fue analizado un total de 14 genotipos. De ellos, las muestras de los carriles 2 y 7, correspondientes a “Brigitta”, presentaron una variación en el marcador CA-421, cambiando el alelo de 198 (muestra 2) a 200 pb (muestra 7), sin cambiar el resto del patrón de alelos de éstos y los otros marcadores, lo que constituye una mutación característica de las secuencias simples repetidas (SSR).

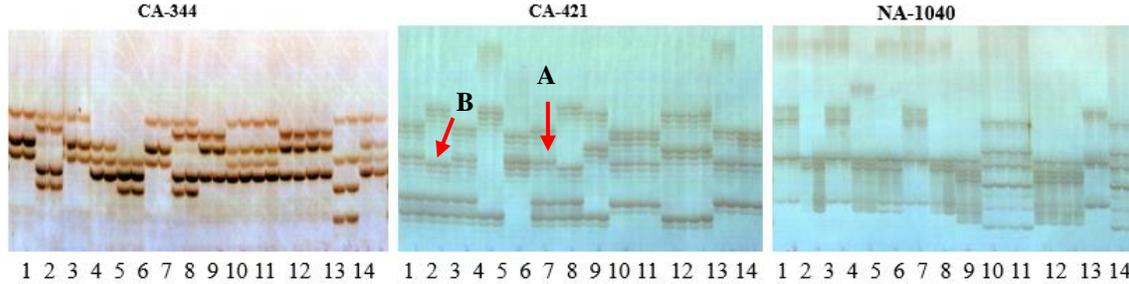
**Cuadro 5:** Genotipos con mutación confirmada mediante tres marcadores SSR

Genotipo	Patrón original			Patrones con mutación		
	CA-344	CA-421	NA-1040	CA-344	CA-421	NA-1040
Bluecrop	153-156-162-168	166-170-182-198	184-192-210-216	153-156-162-168	Nulo-170-182-198	184-192-210-216
Bonita	156-159-162	180-186-192-198	188-200-216-228	156-159-162	170-180-186-192-198	188-200-216-228
Brigitta	153-156-165-168	166-170-180-198	188-190-192-256	153-156-165-168	166-170-180-198	188-190-192-Nulo
Brigitta	153-156-165-168	166-170-180-198	188-190-192-256	153-156-165-168	166-170-180-200	188-190-192-256
Brigitta	153-156-165-168	166-170-180-198	188-190-192-256	153-156-165-168	166-170-180-194	188-190-192-256
Brighthwell	156-159	170-180-182-190-192	180-196-208-220	153-156-159-162	170-180-Nulo -192	180-196-208-220
Corona	147-159-162	168-186-192-198	182-188-192-216	147-159-162	168-186-192-Nulo	182-188-192-216
Draper	153-156-165	166-186-198-208	184-188-196	ND	166-186-198-202	ND
Draper	153-156-165	166-186-198-208	184-188-196	153-156-165	166-186-198-206	184-188-196
Duke	156-162-165	166-186-198	184-186-188-192	156-162-Nulo	166-186-198	184-186-188-192
Duke	156-162-165	166-186-198	184-186-188-192	156-162-165	166-186-Nulo	184-186-188-192
Duke	156-162-165	166-186-198	184-186-188-192	156-162-165	166-182-186-198	184-186-188-192
Eliot	153-156-159-162	182-190	188-192-256	153-156-159-(162)	182-190-192	188-192-256
Farthing	147-156-159-168	162-186-192-200	182-188-192	147-156-159-168	162-186-192-198	182-188-192
Julietta	147-156-165	186-190-192-198	192-210	147-156-165	186-190-192-Nulo	192-210
Legacy	156-159-162-168	170-182-190-192	182-190-196-210	156-159-162-168	168-182-190-192	182-190-196-210
NN CM 2008	153-156-162	182-190-198	186-192-210-216	153-156-162	182-190-194-198	186-192-210-216
Rocío	159-168	168-192-198-224	188-190-192-194	159-168	168-192-198-214	188-190-192-194
Sierra	156-162-165	166-170-190	184-188-192-256	156-162-165	166-170-190-194	184-188-192-256

Se indican con rojo los alelos que habrían cambiado de tamaño molecular, y con "Nulo" cuando una banda se pierde en el patrón con la posible mutación identificada y ND, no determinado.



**Figura 1:** Electroforesis en gel de poliacrilamida para nueve muestras de *Vaccinium corymbosum* L. Los carriles corresponden a 1= referencia de cv. Duke, 2= Draper, 3=Draper, 4= "Duke", 5= Legacy, 6=Legacy, 7=Osorno, 8=Corona y 9=Duke. Flecha roja en el marcador NA-1040 indica la presencia de un alelo de una muestra de "Duke" que cambia 190 pb a 188 (comparar carriles 1, 4 y 9).



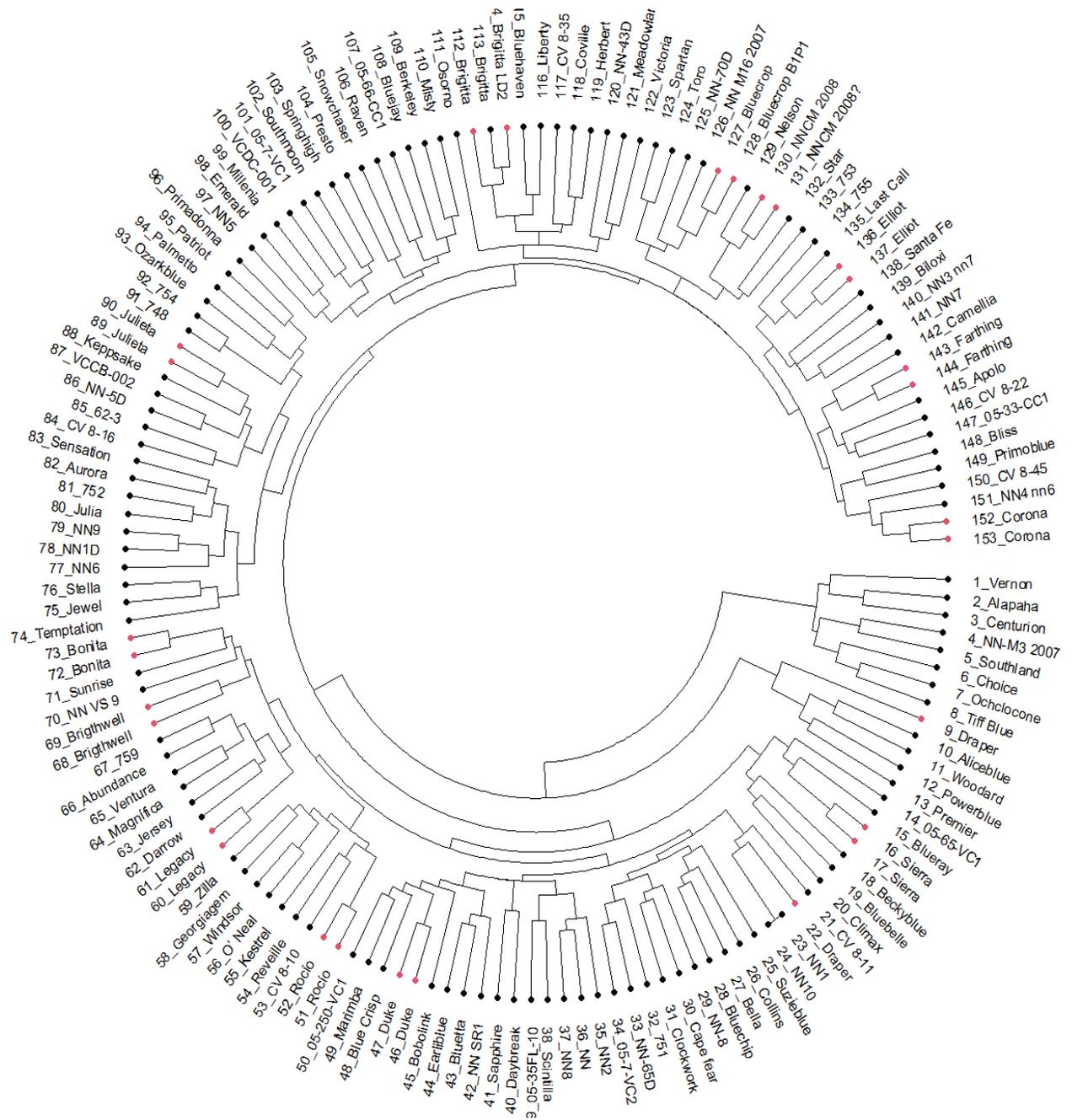
**Figura 2:** Electroforesis en gel de poliacrilamida con los tres marcadores usando 14 muestras de *Vaccinium corymbosum* L. Los carriles corresponden a los siguientes cultivares: 1= Ozarkblue, 2= “Brigitta”, 3=Ozarkblue, 4= O’Neal, 5= Elliot, 6= Ozarkblue, 7=Brigitta, 8=Duke, 9=Legacy, 10=Legacy, 11=Duke, 12=Duke, 13=Biloxi y 14=Legacy. Las flechas rojas destacan los cambios en el cv. Brigitta (carriles 2 y 7), que cambia de su tamaño estándar (198 pb, A) a un tamaño mayor (200 pb, B).

El dendrograma obtenido de la matriz de disimilitud de los datos de marcadores SSR para las 143 variedades por el método de agrupamiento UPGMA (Figura 3), reveló que hay un grupo principal de 130 variedades y líneas, la que se separó claramente de otro grupo menor, integrado por 13 genotipos.

A su vez, este grupo menor se dividió en dos sub-grupos, uno de cinco genotipos menos distantes del conjunto principal (integrado por los cvs. Premier, Powerblue, Woodard y Aliceblue) y otro de ocho genotipos más distintas, que incluye los cvs. Tiffblue, Ochlocone, Choice, Southland, Centurion, Alapha y Vernon, más el genotipo NN-M3.

Varios de estos genotipos tienen un fondo genético complejo, compuesto de varias de especies de *Vaccinium*, tales como: *V. corymbosum*, *V. angustifolium*, *V. darrowi* y *V. ashei*. Así, cerca de 75% de las actuales variedades, genotipos y líneas de arándanos proviene de cruces de *V. corymbosum* y *V. angustifolium*, por ejemplo, las variedades: “Bluecrop”, “Jersey”, “Weymouth”, “Blueray” y “Berkeley” (Mainland *et al.*, 2016).

Otros ejemplos son Legacy que es 25% *V. darrowi* y 2 % *V. angustifolium*; y ‘Sierra’, con 20 % *V. darrowi*, 15% *V. ashei*, 13% *V. constablei* y 2 % *V. angustifolium* en su genoma (Hancock *et al.* 2008). En general, el pedigrí de las variedades de arándanos es bastante complejo (Brevis *et al.*, 2008), pudiendo tener un fondo de *northern highbush blueberry* (NHB) o *southern highbush blueberry* (SHB), lo que explica la formación de diferentes agrupaciones entre los cultivares de *Vaccinium* estudiados (Hancock, 2006).



**Figura 3:** Dendrograma generado por el análisis de conglomerados de UPGMA a partir de la matriz de similitud obtenida por la distancia euclídea de los polimorfismos de SSRs para los 143 genotipos analizados. Los puntos rosa corresponden a variantes con supuesta mutación detectados por los marcadores SSR.

## DISCUSIÓN

Los estudios sobre detección y análisis de mutaciones espontáneas en arándanos (*Vaccinium corymbosum* L.); son escasos. Como se ha presentado, de los 12 marcadores SSR probados inicialmente para evaluar la diversidad genética de la especie (Cuadro 2), se eligieron tres (CA-344, CA-421 y NA-1040) porque presentaban una alta capacidad de discriminación entre genotipos, lo que ha permitido la correcta diferenciación e identificación de las variedades y líneas estudiados en INIA La-Platina hasta la fecha. Esto ha permitido construir una base de datos que asigna una combinación de alelos particulares para cada uno de los 143 genotipos considerados. De esta manera, los otros nueve marcadores no fueron considerados en este análisis. Los resultados de los 143 genotipos de arándanos evaluados (Cuadro 3) se compararon con una de las bases de datos más completa que existen para la especie, disponible en el repositorio genético de USDA-ARS de Corvallis, Oregon, EE.UU (Hinrichsen *et al.*, 2009), mostrando plena coincidencia.

Con los tres marcadores SSR se amplificó un total de 1581 amplicones de los 143 genotipos evaluados (anexo 3), de los cuales 485, 559 y 537 amplicones fueron identificados sumando todos los genotipos, con los tres marcadores SSR. Estos amplicones corresponden a 9 alelos de CA-344, 31 de CA-421 y 30 de NA-1040, con un rango de tamaño general de 147-256 bp (Cuadro 4). Resultados similares fueron observados en los estudios desarrollados por Boches *et al.* (2005). El valor de PIC promedio (0,878) fue equivalente al presentado en los estudios previos que habían considerado un número bastante menor de genotipos (Hinrichsen *et al.*, 2009). Por otra parte, se confirmó la capacidad discriminante de los tres marcadores usados para *fingerprinting*, CA-344, CA-421 y NA-1040, pues incluso usando solo dos de ellos es posible diferenciar los 143 variedades y líneas analizados.

Los valores de heterocigosidad promedio observada ( $H_o$ ) y esperada ( $H_e$ ) obtenidos en este estudio fueron 0,890 y 0,886 respectivamente. Por lo tanto, son ligeramente más altos que los reportados en los estudios de *fingerprinting* en cultivares de arándanos realizados por Hinrichsen *et al.* (2009). Estos altos valores de heterocigosidad revelan altos niveles de diversidad en arándano, lo que se puede explicarse por ser una especie tetraploide, aunque también a la hibridación histórica e iterativa entre diferentes especies del género (Muñoz, 1980 ; INIA, 2017; Rubio *et al.*, 2018). Por otro lado, los elevados valores de  $H_e$  indican la capacidad de cada marcador para diferenciar dos o más cultivares elegidos al azar (Narváez *et al.*, 2001).

Respecto de las variaciones alélicas intra-varietales, foco principal del presente estudio, estas fueron identificadas en 14 genotipos (Figura 3), es decir, un 9,8% de los genotipos estudiados, que presentaron patrones de bandas diferentes a sus respectivas variedades de referencia. Estas variaciones se pueden clasificar en dos tipos, por una parte, hay alelos que cambian de tamaño, que corresponden a ocho (57,14% del total observado); desde una perspectiva analítica, estos cambios son los más simples de identificar.

El otro tipo de modificación es cuando una banda ha desaparecido del patrón alélico, lo que fue observado en seis cultivares (42,9%) y que puede corresponder a dos situaciones: por una parte, puede tratarse de un alelo nulo (Cuadro 5), es decir un sitio de unión del partidor (o ambos) en una cromátida que ha mutado, y, por lo tanto, no hay amplificación posible y no se obtiene un amplicón.

El otro caso hipotético es que haya una mutación como el primer caso, pero el tamaño del alelo coincide con otro de los alelos del patrón, por lo que “desaparece” una banda (en efecto, una de ellas es doble, lo que en PCR puede no ser apreciable a simple vista y requeriría un ensayo cuantitativo). Ejemplo de estos cambios de los patrones alélicos se muestran en la (Figura 1) para los SSRs CA-344, CA-421 y NA-1040. Destaca entre estos SSR CA-421, donde se identificó la mayor parte de las variaciones intra-varietales (mutaciones), donde incluso en un caso (cv. Bonita) apareció un alelo supernumerario, es decir un quinto alelo, lo que podría corresponder a un artefacto de la técnica (por ejemplo, una banda que aparece como un fragmento amplificado, pero que en efecto puede ser producto del “tartamudeo” o *stuttering* que presentan con más frecuencia algunos loci de SSR).

Otra posible explicación para estos alelos supernumerarios es una “quimera” histológica, como lo que ha sido descrito en otras especies leñosas de propagación vegetativa, como la vid, donde coexisten capas celulares del tipo L1 y L2, aportando cada una alelos diferentes por ser portadoras de mutaciones independientes (Martínez-Zapater *et al.*, 2014) lo que hace aparecer un número de alelos superior al que corresponde de acuerdo a la ploidía de la especie en estudio (en caso de *V. corymbosum* L., más de cuatro alelos en un tetraploide).

Los cambios se verificaron cómo la pérdida o delección, o bien inserción o sustitución de una o más repeticiones de unidades del microsatélite donde las variaciones tuvieron un rango de  $\pm 2$  a 10 nucleótidos. También se registró un genotipo (Draper) que presentó alelos nulos en los loci CA-344 y NA-1040 (presumiblemente una mutación). Estas mutaciones pueden o no estar asociadas a una recombinación homóloga que conlleva a la interrupción de una secuencia codificante, comúnmente generando genes que son traducidos a proteínas abortivas o no funcionales (Benavides *et al.*, 2014; Paredes *et al.*, 2018).

Es posible también que la ocurrencia de las mutaciones en los genotipos de arándanos estudiados esté asociada con la edad de las plantas (Anexo 2) o más bien el tiempo que llevan siendo propagadas en cultivo *in vitro*. Como la mayoría de ellos fueron introducidos a Chile en la década del 1980 (INIA, 2017), es probable que desde entonces se han multiplicado por la técnica de micropropagación *in vitro* (Jimenez, 2011; Lamo *et al.*, 2017; INIA, 2017; INTA, 2017).

Las mutaciones también podrían estar asociadas a los componentes del medio de cultivo (líquido o sólido). Por ejemplo, el uso de reguladores de crecimiento (fitohormonas) puede influir en la aparición de variantes somaclonales o mutaciones; así también un

mismo tejido responde o se comporta de diferente manera frente a factores de estrés mecánico asociados a la propagación artificial (oxigenación, tensión superficial, daños por contacto) (Shu, Forster, & Nakagawa, 2012; Cardone *et al.*, 2010).

Por ejemplo, una deficiencia en la oxigenación del callo causa la producción de etanol, el cual puede actuar como agente mutagénico (Rubio *et al.*, 2018; Sánchez-Chiang y Jiménez, 2008; Cardone *et al.*, 2004). En otro caso, se encontró que explantes de piña (*Ananas comosus* cv. Amarelinho) cultivados en un sistema de inmersión temporal (medio líquido), presentaron tasas mayores de variación somaclonal o mutaciones que en cultivos semisólidos (Aruna *et al.*, 1995; Singh *et al.*, 2011; Mba, 2013).

Estos resultados pueden ser complementarios a los presentados por Martínez *et al.* (2007), quienes estudiando los patrones genéticos en distintas muestras de arándanos (*Vaccinium* sp) mediante la técnica de marcadores moleculares RAPD (polimorfismo de ADN con partidores de diseño aleatorio), constataron que ese tipo de marcador molecular les permitió detectar adecuadamente la existencia de plantas fuera de tipo, aunque no confirmaron si la aparición de ellas estaría asociada a mutaciones espontáneas.

Por otro lado, este estudio se puede comparar a aquel desarrollado por Aranzana *et al.* (2003), quienes trabajando con marcadores microsatélites en el cultivo de duraznero [*Prunus persica* (L.) Batsch] obtuvieron el genotipo mutante que presentó nuevos alelos con  $\pm 2$  bp en tres casos y pérdida de alelos en otros dos casos, presumiblemente mutantes con alelo nulo. Así también, un caso similar de mutaciones por cambios de tamaño de alelos y presencia de alelos supernumerarios ha sido descrito en vides (Moncada *et al.*, 2006; Pelsy *et al.*, 2010).

Otro estudio es de Martins-Lopes *et al.* (2001) quienes trabajando con SSCP (*single strand conformation polymorphism*) detectaron las variaciones alélicas de 1 a 6 en nucleótidos simples en el cultivo de trigo (*Triticum aestivum*). Además, el presente estudio coincide con lo descrito por Gisbert *et al.* (2016), quienes trabajando con marcadores microsatélites (SSR) lograron identificar mutaciones espontáneas en la berenjena (*Solanum melongena* L.) variedad “Black Beauty”.

Los resultados presentados en la presente investigación son pioneros en el estudio del fenómeno de las mutaciones en arándano en Chile y el mundo, con base en marcadores co-dominantes de tipo SSR. A partir de estos resultados, se hace necesario realizar investigaciones adicionales para caracterizar con precisión el fenómeno de las mutaciones en loci SSR, las que podrían ser analizadas secuenciando los fragmentos amplificados de tamaño variable para confirmar las mutaciones detectadas en este trabajo, para definir los cambios a nivel de su secuencia de nucleótidos. Con ello, se esperaría confirmar un aumento o disminución del número de repeticiones básicas de los microsatélites en cuestión.

Así también, estos resultados se podrían complementar con el uso de marcadores de tipo dominante, como son los fragmentos amplificados de largo variable (AFLP), comparando

las mismas variedades que fueron estudiadas en el presente estudio y verificando su capacidad discriminante y las relaciones de similitud genética entre muestras y formación de clados, entre otros.

El conjunto de esta información sería la base para la correcta selección de los genotipos o especímenes de cada genotipo para el establecimiento de viveros y de plantaciones de arándanos cuyo patrón genético sea conocido y descartando cualquier sospecha de ocurrencia de mutaciones, garantizando así una adecuada uniformidad y calidad genética de las plantaciones, con la consecuente mejora de la producción y productividad de los huertos en Chile. Por otra parte, esta información basada en análisis de SSRs puede incorporarse al procedimiento de propagación de cultivares a nivel de viveros, apoyando de esta manera tanto la identidad (autenticidad) varietal, como la homogeneidad del material y ausencia de mutaciones o quimeras, como una prueba robusta y fiable.

Finalmente, las mutaciones que se han identificado en el presente estudio, así como otras que se puedan identificar a futuro, podrían ser útiles para los programas de mejora genética de arándano en Chile, porque, aunque es un fenómeno intrínsecamente indeseable para el cultivo de las plantas, es una fuente de variabilidad genética que puede también ser beneficiosa en el desarrollo de nuevas variedades.

## CONCLUSIONES

Tres de doce marcadores microsatélites (SSR) evaluados demostraron un alto nivel de polimorfismo y capacidad para diferenciar genotipos de arándanos en forma perfectamente reproducible. Además, estos tres marcadores fueron capaces de mostrar la presencia de variantes alélicas o mutaciones intravarietales. De las 143 genotipos y líneas recogidas en viveros y huertos de Chile, 14 presentaron patrones de bandas (alelos) diferentes a las variedades de referencia, lo que demuestra la presencia de mutaciones en estos genotipos. Estas mutaciones corresponderían a una inserción o pérdida de unidades repetidas del SSR, donde las variaciones tuvieron un rango de  $\pm 2$  a 10 nucleótidos, registrándose también 6 genotipos con alelos nulos, o la pérdida del sitio de unión de uno o ambos partidores de PCR. El marcador que presentó más variantes fue CA-421, seguido por NA-1040.

## LITERATURA CITADA

- Bruckner, C.H.; Albuquerque A.S. 2005. Mejoramiento de Fruteras. In: Borém, A. Mejoramiento de especies cultivadas.
- Aranzana, M. J., Carb, J., & Ar, P. (2002). Microsatellite variability in peach [ *Prunus persica* ( L .) Batsch ]: cultivar identification , marker mutation , pedigree inferences and population structure. *Springer*, 1341–1352.
- Aruna, M., Austin, M. E., & Ozias-Akins, P. (1995). Randomly amplified polymorphic DNA fingerprinting for identifying rabbiteye blueberry (*Vaccinium ashei* Reade) cultivars. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 120(5), 710–713.
- Bairu, M. W., Aremu, A. O., & van Staden, J. (2011). Somaclonal variation in plants: Causes and detection methods. *Plant Growth Regulation*, 63(2), 147–173.
- Benavides, F. J., Guénet, J., & Benavides, F. J. (2014). Principios básicos y aplicaciones. In *Manual de Genética de Roedores de Laboratorio* (p. 227).
- Bidabadi, S. S., & Jain, S. (2020). Cellular, molecular, and physiological aspects of in vitro plant regeneration. *Plants*, 9(6), 10–13.
- Boches, P., Nahla, B., & Rowland, L. (2005). *AN ABSTRACT OF THE THESIS OF Title: Microsatellite Marker Development and Molecular Characterization in Highbush*.
- Brevis, P. A., Bassil, N. V., Ballington, J. R., & Hancock, J. F. (2008). Impact of wide hybridization on highbush blueberry breeding. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 133(3), 427–437.
- Cadima, X., Veramendi, S., & Gabriel, J. (2013). Uso de marcadores moleculares microsatélite para el análisis de la diversidad genética de papa nativa de Bolivia Using simple sequence repeats molecular markers to analyze the genetic diversity of potato landraces from Bolivia Introducción. *J Selva Andina Res Soc.*, 4(1), 18–30.
- Cardone, S., Olmos, S., & Echenique, V. (2010). *II . Capítulo 5 Variación somaclonal. January*.
- Fedefruta. (2018). “*Alternativas del desarrollo frutícola en la Región de Los Lagos y su mecanización.*” 45.
- Gisbert, C., Dumm, J. M., Prohens, J., Vilanova, S., & Stommel, J. R. (2016). A spontaneous eggplant (*Solanum melongena* L.) color mutant conditions anthocyanin-free fruit pigmentation. *HortScience*, 51(7), 793–798.
- Hancock, J. (2006). Northern highbush blueberry breeding. *Acta Horticulturae*, 715, 37–40.
- Hancock, Lyrene, P., Finn, C. E., Vorsa, N., & Lobos, G. A. (2008). Blueberries and cranberries. In *Temperate Fruit Crop Breeding: Germplasm to Genomics* (Issue January).
- Hardy, O. J. (2016). Population genetics of autopolyploids under a mixed mating model and the estimation of selfing rate. *Molecular Ecology Resources*, 16(1), 103–117.
- Hinrichsen, P. (2016). Trazabilidad genética de variedades frutales mediante herramientas moleculares. *Inia Tierra Adentro, February*, 2–5.
- Hinrichsen, P., Castro, M. H., Ravest, G., Rojas, G., Méndez, M., & Bassil, N. V. (2009). Minimal Microsatellite Marker Panel for Fingerprinting Blueberry Cultivars. *International Society for Horticultural Science*, 173–180.

- Hortifrut. (2019). *Emisión inaugural de bonos corporativos Emisión inaugural de bonos Información importante*.
- INIA. (2017). Manual de manejo agronómico del arándano. *Boletín INIA/ No 06*, 2–98.
- INTA. (2017). Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II. In *ArgenBio* (Issue 60).
- Jelenić, S., Berljak, J., Papeš, D., & Jelaska, S. (2001). Mixoploidy and Chimeric Structures in Somaclones of Potato (*Solanum tuberosum* L.) cv. Bintje. *Food Technology and Biotechnology*, 39(1), 13–17.
- Jimenez, C. (2011). Simposio sobre el fitomejoramiento para el futuro 21. *Ginebrea, Suiza*, 2–136.
- Lamo, K., Ji Bhat, D., Kour, K., & Singh, S. S. P. (2017). Mutation Studies in Fruit Crops: A Review. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 6(12), 3620–3633.
- Mainland, C., V., F., & Coville, M. (2016). Coville's Serendipitous Association with Blueberries Leading to the Whitesbog Connection Charles. *Horticultural Crops Research Station*, 469(3), 319–323.
- Martínez-Zapater, J. M., Fernández, L., Torres-Pérez, R., Royo, C., Grimplet, J., Carbonell-Bejerano, P., Lijavetzky, D., Baroja, E., Martínez, J., García-Escudero, E., & Ibáñez, J. (2014). Base genética y molecular de la variación somática en la vid. *I Jornada Del Grupo de Viticultura y Enología*, 70, 47–53.
- Martinez, M. C., Tamayo Plata, M. ., & Hopp, H. . (2007). Identificación molecular de patrones genéticos en distintas muestras de arándano (*Vaccinium* sp). *Revista de Investigaciones Agropecuarias - RIA*, 36(2), 3–15.
- Martins-Lopes, P., Zhang, H., & Koebner, R. (2001). Detection of Single Nucleotide Mutations in Wheat Using Single Strand Conformation Polymorphism Gels. *Plant Molecular Biology Reporter*, 19(2), 159–162.
- Masuelli, R. W., & Marfil, C. F. (2011). Variabilidad epigenética en plantas y evolución. *BAG - Journal of Basic and Applied Genetics*, 22(1).
- Mba, C. (2013). Induced Mutations Unleash the Potentials of Plant Genetic Resources for Food and Agriculture. *Agronomy*, 200–231.
- Meirmans, P. G., Liu, S., & Van Tienderen, P. H. (2018). The Analysis of Polyploid Genetic Data. *Journal of Heredity*, 109(3), 283–296.
- Moncada, X., Pelsy, F., Merdinoglu, D., & Hinrichsen, P. (2006). Genetic diversity and geographical dispersal in grapevine clones revealed by microsatellite markers. *Genome*, 49(11), 1459–1472.
- Munoz, C. (1980). *ARANDANOS: VARIEDADES Y SU PROPAGACION* (p. 15).
- Narváez, C., Castro, H., Valenzuela, J., & Hinrichsen, P. (2001). Fingerprinting of wine grape cultivars most commonly grown in Chile based on microsatellite markers. In *Agricultura Técnica Chile* (Vol. 61, Issue 3, pp. 249–261).
- Nayar, N. K., Fu, Y., Xiao, W., & Moulton, C. (1997). Mutation Breeding Newsletter. *FAO*, 43, 3–67.
- Oliveira, R. P. De, Machado, M. A., Ferreira, E. A., Filho, W. dos S. S., Scivittaro, W. B., & Gesteira, A. da S. (2014). Melhoramento genético de plantas cítricas. *Informe Agropecuario*, 35(281), 1–9.
- Ormazábal, Y. M., Mena, C. A., & Cantillana, J. C. (2020). *Caracterización de predios productores de arándanos ( Vaccinium corymbosum ), según nivel tecnológico . El*

- caso de la región del Maule-Chile Characterization of farm fields of Blueberry ( Vaccinium corymbosum ) according to technological level . The case . 31(1), 41–52.*
- Paradis, E., & Ahumada, J. A. (2003). R para Principiantes. In *Evolution*.
- Paredes, T. ., Narvaez, M. ., & Fernandez, E. . (2018). Inducción de poliploidía con colchicina en vitroplantas de Aloe vera ( L .) Induction of polyploidy with colchicine in vitroplants of Aloe vera ( L .). *Revista Colomb. Biotecnol*, XX(1), 97–105.
- Pelsy, F., Hocquigny, S., Moncada, X., Barbeau, G., Forget, D., Hinrichsen, P., & Merdinoglu, D. (2010). An extensive study of the genetic diversity within seven French wine grape variety collections. *Theoretical and Applied Genetics*, 120(6), 1219–1231.
- Penna, S., & Jain, S. M. (2017). *Mutant Resources and Mutagenomics in crop plants*. 29(9), 651–657.
- Richards, E. J. (2006). Inherited epigenetic variation - Revisiting soft inheritance. *Nature Reviews Genetics*, 7(5), 395–401. <https://doi.org/10.1038/nrg1834>
- Rubio, J. C. G., De Lena Gonzalez, G. G., & Ara, M. C. (2018). *El cultivo del arándano en el norte de España* (pp. 1–194).
- Shu, Q. Y., Forster, B. P., & Nakagawa, H. (2012). Plant mutation breeding and biotechnology. In *FAO*.
- Singh, H. ., Parthasarathy, V. ., & Nirmal Babu, K. (2011). *Advances in Horticulture Biotechnology: Molecular Markers and Marker Assisted Selection - Fruit Crop, Plantation Crops and Species: Vol. III*.
- Zhenghua, C., & Ahuja, M. R. (1993). *Regeneration and Genetic Variation in Plant Tissue Cultures*. 87–100.

**Anexo 1: Los Genotipos de Arándanos estudiados**

Nº	Genotipo	Procedencia (Vivero)	Nº	Genotipo	Procedencia (Vivero)
1	Alapaha	4	40	Biloxi	10
2	Apolo	4	41	Bella	4
3	Aliceblue	1	42	Bliss	4
4	Beckyblue	1	43	Bobolink	4
5	Berkeley	1	44	Bonita	4
6	Blue Crisp	4	45	Choice	1
7	Bluebelle	1	46	Corona	4
8	Bluecrop	1	47	CV 8-10	4
9	Bluehaven	1	48	CV 8-11	4
10	Bluejay	1	49	CV 8-16	4
11	Blueray	1	50	CV 8-22	4
12	Bluetta	1	51	CV 8-35	4
13	Bonita	1	52	CV 8-45	4
14	Brigitta	1	53	Daybreak	4
15	Brighthwell	1	54	Draper	9
16	Camellia	4	55	Earliblue	1
17	Cape fear	1	56	Georgiagem	1
18	Centurion	1	57	Jewel	4
19	Choice	1	58	Julia	4
20	Climax	1	59	Liberty	4
21	Collins	1	60	Marimba	1
22	Coville	1	61	Nelson	1
23	Darrow	1	62	Ochclocone	4
24	Duke	4	63	Palmetto	4
25	Elliott	1	64	Powerblue	1
26	Herbert	1	65	Reveille	1
27	Jersey	1	66	Rocío	4
28	Legacy	1	67	Santa Fe	4
29	Misty	1	68	Sapphire	4
30	O' Neal	1	69	Southland	1
31	Ozarkblue	1	70	Star	4
32	Patriot	1	71	Vernon	4
33	Premier	1	72	Woodard	1
34	Sierra	1	73	748	4
35	Spartan	1	74	751	4
36	Sunrise	1	75	752	4
37	Toro	1	76	Clockwork	12
38	Aurora	7	77	Emerald	11
39	Abundance	12	78	Farthing	12

**Anexo 1. 1: Los Genotipos de Arándanos estudiados (continuación)**

Nº	Genotipo	Procedencia	Nº	Genotipo	Procedencia (Vivero)
----	----------	-------------	----	----------	----------------------

		(Vivero)			
79	Julieta	4	113	62-3	4
80	Keppsake	4	114	759	4
81	Kestrel	4	115	05-33-CC1	9
82	Last Call?	19	116	05-35FL-10	4
83	Magnífica	16	117	05-7-VC1	9
84	Meadowlark	4	118	05-7-VC2	9
85	Millenia	12	119	NN-43D	14
86	NN	4	120	NN5	18
87	NN M16 2007	13	121	NN-5D	14
88	NN SR1	15	122	NN6	18
89	NN VS 9	20	123	NN-65D	14
90	NN1	18	124	NN7	18
91	NN10	18	125	NN-70D	14
92	NN1D	14	126	NN8	18
93	NN2	18	127	NN9	18
94	NN3 nn7	18	128	NNCM 2008	13
95	NN4 nn6	18	129	NN-M3 2007	13
96	Osorno	4	130	Primadonna	17
97	Presto	4	131	Primoblue	9
98	Raven	4	132	Snowchaser	12
99	Scintilla	4	133	Springhigh	12
100	Sensation	4	134	Suzieblue	12
101	Southmoon	8	135	Temptation	9
102	Stella	4	136	VCCB-002	13
103	Tiff Blue	6	137	VCDC-001	13
104	Zilla	4	138	Ventura	12
105	753	4	139	Victoria	12
106	754	4	140	Windsor	12
107	755	4	141	05-250-VC1	9
108	759	4	142	05-65-VC1	9
109	05-33-CC1	9	143	05-66-CC1	9
110	05-35FL-10	4			
111	05-7-VC1	9			
112	05-7-VC2	9			

**Anexo 2:** Cultivares de arándano y año de introducción en Chile

Cultivares de Highbush	Fecha de introducción	Cultivares de Rabbitteye	Fecha de introducción
------------------------	-----------------------	--------------------------	-----------------------

Berkeley	Octubre, 1979	Aliceblue	Diciembre, 1985
Coville	Octubre, 1979	Beckyblue	Diciembre, 1985
Earlyblue	Octubre, 1979	Bluebelle	Diciembre, 1985
Herbert	Octubre, 1979	Brightwell	Diciembre, 1985
Jersey	Octubre, 1979	Bonita	Diciembre, 1985
Atlantic	Diciembre, 1982	Centurion	Diciembre, 1985
Bluecrop	Diciembre, 1982	Choice	Diciembre, 1985
Blueray	Diciembre, 1982	Chaucer	Diciembre, 1985
Concord	Diciembre, 1982	Climax	Diciembre, 1985
Rancocas	Diciembre, 1982	Delite	Diciembre, 1985
Stantey	Diciembre, 1982	Gardenblue	Diciembre, 1985
Bluejay	Mayo, 1984	Premier	Diciembre, 1985
Bluetta	Mayo, 1984	Powderblue	Diciembre, 1985
Collins	Mayo, 1984	Southland	Diciembre, 1985
Elliot	Mayo, 1984	Tifblue	Diciembre, 1985
Northland	Mayo, 1984	Woodard	Diciembre, 1985
Patriot	Mayo, 1984		
Bluechip	Diciembre, 1985		

**Fuente:** (Muñoz, 1980)

### Anexo 3: Número de alelos identificados para cada SSR

Nº	Genotipo	CA344	CA-421	NA-1040	Promedio
1	Abundance	3	4	3	3.3
2	Alapaha	5	5	5	5
3	Aliceblue	2	6	2	3.3

4	Apolo	4	4	3	3.7
5	Aurora	3	3	3	3
6	Beckyblue	3	5	5	4.3
7	Bella	2	4	4	3.3
8	Berkeley	4	4	4	4
9	Biloxi	4	4	2	3.33
10	Bliss	4	3	3	3.33
11	Blue Crisp	3	4	3	3.33
12	Bluebelle	2	5	5	4
13	Bluechip	3	4	4	3.7
14	Bluecrop	4	4	4	4
15	Bluecrop B1P1	4	3	4	3.7
16	Bluehaven	4	4	4	4
17	Bluejay	3	3	4	3.3
18	Blueray	2	4	4	3.3
19	Bluetta	3	4	3	3.3
20	Bobolink	3	4	4	3.7
21	Bonita	3	6	4	4.3
22	Brigitta	4	4	3	3.7
23	Brigitta	4	4	4	4
24	Brigitta	4	4	4	4
25	Brigitta LD2	4	4	4	4
26	Brighthwell	4	4	4	4
27	Brighthwell	2	5	4	3.7
28	Camellia	4	3	2	3
29	Cape fear	3	4	4	3.7
30	Centurion	5	5	5	5
31	Choice	3	5	5	4.3
32	Climax	2	5	4	3.7
33	Clockwork	2	4	3	3
34	Collins	3	4	4	3.7
35	Corona	3	4	4	3.7

**Anexo 3:** Número de alelos identificados para cada SSR  
(continuación)

Nº	Genotipo	CA344	CA-421	NA-1040	Promedio
36	Corona	3	3	4	3.3
37	Coville	4	4	4	4
38	CV 8-10	3	4	3	3.3

39	CV 8-11	3	4	2	3
40	CV 8-16	2	3	2	2.3
41	CV 8-22	4	4	3	3.7
42	CV 8-35	4	3	4	3.7
43	CV 8-45	4	4	4	4
44	Darrow	2	4	3	3
45	Daybreak	3	3	4	3.3
46	Draper	3	4	3	3.3
47	Draper	3	4	3	3.3
48	Draper	0	4	0	1.3
49	Duke	3	2	4	3
50	Duke	2	3	4	3
51	Duke	3	4	4	3.7
52	Earliblue	3	4	3	3.3
53	Elliot	4	2	3	3
54	Elliot	4	3	3	3.3
55	Emerald	4	2	4	3.3
56	Farthing	4	4	3	3.7
57	Farthing	4	4	3	3.7
58	Georgiagem	3	3	4	3.3
59	Herbert	4	4	3	3.7
60	Jersey	3	4	3	3.3
61	Jewel	3	4	2	3
62	Julia	3	3	3	3
63	Julieta	3	4	2	3
64	Julieta	3	3	2	2.7
65	Keppsake	3	3	2	2.7
66	Kestrel	3	3	4	3.3
67	Last Call	3	3	3	3
68	Legacy	4	4	4	4
69	Liberty	4	3	3	3.3
70	Magnífica	3	4	3	3.3
71	Marimba	3	3	4	3.3
72	Meadowlark	3	4	3	3.3
73	Millenia	3	2	4	3
74	Misty	4	4	4	4
75	Nelson	3	4	4	3.7

**Anexo 3: Número de alelos identificados para cada SSR**  
(continuación)

Nº	Genotipo	CA344	CA-421	NA-1040	Promedio
76	NN	4	4	4	4
77	NN M16 2007	4	5	4	4.3
78	NN SR1	3	4	3	3.3
79	NN VS 9	3	4	3	3.3
80	NN1	3	3	4	3.3

81	NN10	3	4	3	3.3
82	NN1D	2	2	3	2.3
83	NN2	3	4	4	3.7
84	NN3 nn7	4	4	3	3.7
85	NN4 nn6	3	3	3	3
86	NN-43D	4	4	4	4
87	NN5	4	2	4	3.3
88	NN-5D	4	3	2	3
89	NN6	3	2	2	2.3
90	NN-65D	2	3	3	2.7
91	NN7	3	3	3	3
92	NN-70D	3	4	4	3.7
93	NN8	3	4	3	3.3
94	NN-8	3	4	4	3.7
95	NN9	2	2	3	2.3
96	NNCM 2008	3	3	4	3.3
97	NNCM 2008?	3	4	4	3.7
98	NN-M3 2007	4	6	5	5
99	O' Neal	3	3	4	3.3
100	Ochclocone	4	5	5	4.7
101	Osorno	4	4	2	3.3
102	Ozarkblue	3	4	4	3.7
103	Palmetto	3	4	3	3.3
104	Patriot	2	4	3	3
105	Powerblue	2	5	3	3.3
106	Premier	3	5	5	4.3
107	Presto	4	3	4	3.7
108	Primadonna	2	4	3	3
109	Primobblue	4	4	4	4
110	Raven	4	3	4	3.7
111	Reveille	2	4	4	3.3
112	Rocío	2	4	4	3.3
113	Rocío	2	4	4	3.3
114	Santa Fe	4	4	4	4
115	Sapphire	2	4	4	3.3

**Anexo 3: Número de alelos identificados para cada SSR**  
(continuación)

Nº	Genotipo	CA344	CA-421	NA-1040	Promedio
116	Scintilla	3	3	3	3
117	Sensation	2	2	3	2.3
118	Sierra	3	4	4	3.7
119	Sierra	3	3	4	3.3
120	Snowchaser	4	2	4	3.3

121	Southland	3	6	4	4.3
122	Southmoon	3	2	4	3
123	Spartan	3	3	3	3
124	Springhigh	3	3	4	3.3
125	Star	4	4	4	4
126	Stella	3	4	2	3
127	Sunrise	3	4	3	3.3
128	Suzieblue	3	4	4	3.7
129	Temptation	4	4	3	3.7
130	Tiff Blue	4	5	5	4.7
131	Toro	4	3	3	3.3
132	VCCB-002	3	3	2	2.7
133	VCDC-001	3	3	4	3.3
134	Ventura	3	3	3	3
135	Vernon	4	4	6	4.7
136	Victoria	3	3	3	3
137	Windsor	3	3	4	3.3
138	Woodard	2	2	3	2.3
139	Zilla	3	3	4	3.3
140	748	3	3	2	2.7
141	751	2	2	4	2.7
142	752	3	3	3	3
143	753	3	3	3	3
144	754	3	3	3	3
145	755	4	4	4	4
146	759	3	3	4	3.3
147	05-250-VC1	2	2	4	2.7
148	05-33-CC1	4	3	3	3.3
149	05-35FL-10	3	4	4	3.7
150	05-65-VC1	1	4	4	3
151	05-66-CC1	4	3	3	3.3
152	05-7-VC1	3	3	4	3.3
153	05-7-VC2	3	3	3	3
154	62-3	3	3	2	2.7