

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

**MEMORIA DE TÍTULO**

**EVALUACIÓN DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA DE ACCESIONES DE  
GUINDOS (*Prunus cerasus* L.) DE LA REGIÓN DEL BIOBÍO, MEDIANTE EL  
USO DE MARCADORES MICROSATÉLITES**

**LILIANA MARÍA PAILAHUEQUE COLIQUEO**

**Santiago, Chile**  
**2014**

**UNIVERSIDAD DE CHILE**

**Facultad de Ciencias Agronómicas**

**Escuela de Pregrado**

**MEMORIA DE TÍTULO**

**EVALUACIÓN DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA DE ACCESIONES DE  
GUINDOS (*Prunus cerasus* L.) DE LA REGIÓN DEL BIOBÍO, MEDIANTE EL  
USO DE MARCADORES MICROSATÉLITES**

**ASSESSMENT OF GENETIC DIVERSITY OF SOUR CHERRY (*Prunus cerasus* L.)  
ACCESSIONS FROM THE REGION OF BIOBÍO BY MEANS OF  
MICROSATELLITE MARKERS**

**LILIANA MARÍA PAILAHUEQUE COLIQUEO**

**Santiago, Chile  
2014**

**UNIVERSIDAD DE CHILE**

**Facultad de Ciencias Agronómicas**

**Escuela de Pregrado**

**EVALUACIÓN DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA DE ACCESIONES DE  
GUINDOS (*Prunus cerasus* L.) DE LA REGIÓN DEL BIOBÍO, MEDIANTE EL  
USO DE MARCADORES MICROSATÉLITES**

Memoria para optar al Título  
Profesional de Ingeniero Agrónomo  
Mención Fruticultura

**LILIANA MARÍA PAILAHUEQUE COLIQUEO**

**PROFESORES GUÍAS**

**Calificaciones**

Sr. Rodrigo Infante E.  
Ingeniero Agrónomo, Dr.

6,0

Sr. Patricio Hinrichsen R.  
Bioquímico, Dr.

7,0

**PROFESORES EVALUADORES**

Sr. Ricardo Pertuzé C.  
Ingeniero Agrónomo, Ph. D.

5,5

Sr. Nelson Díaz P.  
Profesor de Estado en Biología y Ciencias, Dr.

6,5

Santiago, Chile  
2014

*A mis padres y a mi familia*

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a mis Padres, María y Segundo por su amor y apoyo incondicional. A mis hermanos que directa o indirectamente me acompañaron en este largo camino. A mis profesores guías por su apoyo y paciencia. A todas las personas que de una u otra manera me ayudaron con su orientación y conocimientos para llevar a cabo esta Memoria de Título, entre ellos, Loreto, Pía y Mariana del Laboratorio de Mejoramiento Genético y Calidad de la Fruta, a Gonzalo, Rodrigo y María Herminia del Laboratorio de Biotecnología del INIA. También agradezco a mis compañeras y amigas por los buenos momentos que compartimos y por su preocupación en los momentos difíciles, Marce, Maca, Priscilla, Vivi, Andrea, Vale Lu, Vane...gracias de corazón.

## ÍNDICE

RESUMEN.....	1
ABSTRACT .....	2
INTRODUCCIÓN .....	3
Hipótesis.....	5
Objetivo.....	5
MATERIALES Y MÉTODOS .....	6
Lugar de desarrollo .....	6
Material Vegetal.....	6
Caracterización morfológica .....	7
Extracción de ADN .....	8
Microsatélites .....	8
Amplificación del ADN mediante PCR.....	9
Visualización de los productos de amplificación del PCR para microsatélites .....	9
Análisis Estadístico .....	10
RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	11
Caracterización morfológica .....	11
Análisis extracción ADN .....	13
Microsatélites .....	14
Diversidad genética.....	16
CONCLUSIONES .....	21
BIBLIOGRAFÍA .....	22
APÉNDICES.....	26

## RESUMEN

En Chile, los guindos han sido utilizados principalmente como portainjerto para cerezos por los pequeños y medianos productores de la Región del Biobío. La propagación de esta especie se ha realizado ya sea mediante estacas o semillas, con escaso control para luego ser utilizados en la implementación de huertos presentando inconvenientes al momento de expresar las características esperadas. Debido a la escasa información sobre el germoplasma existente una caracterización de éste contribuiría a la organización inicial del material. Se utilizaron marcadores del tipo microsatélites (SSRs) con el fin de determinar la diversidad genética de 19 accesiones de guindos recolectados en diversos lugares de la Región del Biobío. Se incluyeron también una accesión proveniente de Mulchén, dos guindos genéticamente conocidos ('St. Morello' y 'Montmorency'), un híbrido ('Gisela 5') y dos cerezos ('Canindex' y 'Compact Stella') como control. Se realizó una breve descripción morfológica de las hojas de 17 accesiones de guindos presentando diferencias entre ellos. Para el análisis mediante microsatélites fueron utilizados 15 partidores, desarrollados en duraznos, cerezos y guindos, los cuales demostraron ser útiles en la amplificación dentro del género. Los microsatélites no presentaron polimorfismo dentro de las accesiones recolectadas en la Región del Biobío, por lo tanto, el árbol de diversidad genética agrupó a las 19 accesiones, más la accesión de Mulchén en una rama, indicando que no existen diferencias entre ellos.

**Palabras claves:** SSR, portainjertos, carozos, ADN.

**ABSTRACT****ASSESSMENT OF GENETIC DIVERSITY OF SOUR CHERRY (*Prunus cerasus* L.)  
ACCESSIONS FROM THE REGION OF BIOBÍO BY MEANS OF  
MICROSATELLITE MARKERS**

Microsatellite markers (SSRs) were used to determine the genetic diversity of 19 samples of sour cherries collected in different places in Region of Biobío. One sample from Mulchén, two sweet cherries, two genetically known sour cherries ('St. Morello' and 'Montmorency'), a hybrid ('Gisela 5') and two sweet cherries ('Canindex' and 'Compact Stella') as a control were also included. A brief morphological description of the leaves of 17 samples of sour cherries showing differences between them was given. For the molecular analysis, 15 microsatellite primers developed in peach, sweet cherry and sour cherry were used, which proved useful in the amplification within the genus. The microsatellites did not show polymorphism within accessions collected from the Region of Biobío, therefore the genetic diversity tree grouped the 19 accessions and the Mulchén sample more on a branch, indicating that there are no differences between them.

**Keywords:** SSR, rootstocks, stone fruits, DNA

## INTRODUCCIÓN

El guindo (*Prunus cerasus* L.) es una especie de hoja caduca clasificada dentro de la familia *Rosaceae*. Según criterios morfológicos forma parte de la sección *Eucerasus* dentro del subgénero *Cerasus* (Rehder, 1947). Es una especie alotetraploide ( $2n=4x=32$ ), resultante del cruzamiento inter-específico entre *P. fruticosa* Pall. y *P. avium* L. Este origen fue propuesto por Olden y Nybom (1968) al observar la similitud de especímenes de *P. cerasus* con híbridos obtenidos de ese cruzamiento. Posteriores estudios confirmaron el origen híbrido del guindo (Hancock y Iezzoni, 1988; Santi y Lemoine, 1990; Schuster y Schreiber, 2000; Tavaud *et al.*, 2004). Geográficamente tiene su origen en torno al Mar Negro y al Mar Caspio siendo difundido con lentitud a otros lugares del mundo, junto con migraciones humanas y animales (Moreno y Manzano, 2002)

El guindo es cultivado por su fruto que es utilizado en la agroindustria y también por ser utilizado como portainjerto para cerezo (Pérez-Sánchez *et al.*, 2008). Entre las características que presenta como portainjerto se encuentran la inducción de una productividad alta y precoz asociada a un efecto enanizante sobre la variedad (Cruz, 2001). Según Loreti y Gil (1993), una de las mayores dificultades que deben enfrentar los fruticultores al implementar un huerto es la elección del portainjerto, ya que de esta decisión dependerá la duración del huerto, el tipo de conducción y la incidencia de las intervenciones en poda y cosecha, que a su vez van a influir en el costo por kilogramo de fruta producido (Claverie, 2001).

En la Región del Biobío, el guindo ha sido utilizado principalmente como portainjerto para el cultivo del cerezo por los pequeños y medianos productores, debido a la adaptación que presenta a las condiciones de suelos arcillosos y de mal drenaje presentes en extensos sectores de la región. Ha sido propagado tradicionalmente mediante semillas y sierpes recolectadas tanto de huertos como de poblaciones asilvestradas. El escaso o nulo control en la propagación de esta especie ha traído como consecuencia obtener huertos con una progenie extremadamente heterogénea en cuanto al vigor, a la compatibilidad de injertación y a la eficiencia productiva, además de presentar problemas de virosis (Loreti y Gil, 1993; Valenzuela, 1998; Cruz, 2001).

Carrasco (2000) señaló que aunque existe una amplia gama de selecciones de portainjertos para cerezos en diferentes partes del mundo, el rango de aquellos factibles de utilizar en Chile para huertos semi intensivos e intensivos se estrecha notoriamente. Claverie (2001) además de coincidir con el anterior autor, indicó la importancia de las investigaciones locales, para tomar decisiones considerando las condiciones edafoclimáticas del área geográfica. Ercisli *et al.*, (2010) señalaron la importancia de un mayor conocimiento en la caracterización genética del material vegetal en estudio para ser utilizado eficientemente en los programas de mejoramiento. Según Lacis *et al.*, (2009), el avance en el mejoramiento de cultivos es impulsado por la diversidad genética disponible, por lo tanto su medición y conocimiento es crucial para desarrollar poblaciones mejoradas. Además, las decisiones

para la recolección, conservación e intercambio de germoplasma se basan en el estudio de su diversidad.

Los métodos clásicos de identificación y caracterización de cultivares en árboles frutales se basan en su mayoría en un amplio conjunto de datos fenotípicos, que a menudo son de difícil evaluación, requieren de mucho tiempo para su colecta y además pueden variar con el medio ambiente y las prácticas culturales. Como alternativa se encuentran los marcadores moleculares basados en el ADN, los cuales son estables, detectables en todos los tejidos de la planta y no dependen del medio ambiente, ni de las condiciones estacionales (Ahmad *et al.*, 2004). Además representan un recurso importante para distinguir entre los individuos y para la investigación de la diversidad genética (Pedersen, 2006), mediante el cálculo de coeficientes de similitud y distancias genéticas, frecuencias alélicas, nivel de heterocigosidad y subdivisión de poblaciones, en un período de tiempo menor al ocupado con estrategias convencionales (Waugh y Powell, 1992).

Los marcadores moleculares del tipo microsatélites o secuencias simples repetidas (SSRs) han demostrado ser una herramienta poderosa para la estimación de la diversidad genética y de las relaciones filogenéticas de las especies basada en la conservación de las secuencias debido a su alta eficiencia. Los SSRs son abundantes en la mayoría de los genomas y co-dominantes, por lo tanto, su contenido de información es muy alto; la amplificación de los microsatélites se basa en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), por lo que requiere poco ADN para la amplificación, además cada *locus* de SSR se encuentra definido por un único par de partidores lo cual facilita el intercambio de información entre laboratorios (Kalia *et al.*, 2011).

Un inconveniente de los SSR es la dificultad de su aislamiento inicial. Sin embargo, son de fácil transportabilidad y pueden ser utilizados en especies distintas de las que fueron aislados originalmente, siendo más efectivos entre especies del mismo género o entre géneros estrechamente relacionados que entre los géneros distantes de la misma familia (Mnejja *et al.*, 2010)

### **Hipótesis**

Existe una alta diversidad genética entre las accesiones de guindo provenientes de la Región del Biobío, medida a través del polimorfismo obtenido mediante la utilización de microsatélites.

### **Objetivo**

Determinar a través del uso de microsatélites la diversidad genética de una colección de guindos recolectados en la Región del Biobío.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Lugar de desarrollo

El material vegetal fue recolectado en la Región del Biobío, teniendo como centro de ubicación la ciudad de Chillán y abarcando un radio de 68 km (Apéndice I). El estudio se realizó en el Laboratorio de Biotecnología del Instituto de Investigaciones Agropecuarias, INIA La Platina.

### Material Vegetal

Se recolectaron brotes en forma aleatoria dependiendo de la disponibilidad de árboles pertenecientes a *P. cerasus*, siendo la mayoría obtenido de huertos caseros y poblaciones asilvestradas, dichas accesiones se encuentran etiquetadas desde el número uno al diecisiete en el Cuadro 1. Además se incluyeron dos accesiones cuya colecta se realizó con anterioridad al de este estudio, tipificados con los números 18 y 19 en el Cuadro 1, una accesión proveniente de la Región de La Araucanía, específicamente de Mulchén, cuatro portainjertos y dos cerezos (*P. avium*). De estos brotes se obtuvo el ADN genómico necesario para realizar las posteriores pruebas.

Las zonas de recolección y número asignado en este estudio para cada accesión se encuentran en el Cuadro 1 y Cuadro 2

Cuadro 1. Número asignado a cada guindo recolectado y zona de recolección

Número de accesión	Zona de Recolección
1	Quillón
2	Quillón
3	Collanco
4	Confluencia
5	Confluencia
6	El Sauce
7	El Sauce
8	San Nicolás

(Continúa)

Cuadro 1. (Continuación).

Número de accesión	Zona de Recolección
9	San Nicolás
10	San Carlos (El Sauce)
11	San Carlos (Camino La Rivera)
12	San Fabián (La Vega)
13	San Fabián (Barrio Buenos Aires)
14	San Fabián (Las Guardias)
15	San Fabián (Las Guardias)
16	San Fabián (Las Guardias)
17	Cato (Rinconada)
18	Quillón
19	San Carlos (Moticura)
20	Mulchén (Región de La Araucanía)

Cuadro 2. Número asignado y especie o híbrido a que corresponden los portainjertos y cerezos utilizados en este estudio.

Nº Accesión	Portainjerto o Variedad	Especie o híbrido
21	CAB-6P	<i>P. cerasus</i>
22	Can Index	<i>P. avium</i>
23	Gisela 5	<i>P. cerasus x P. canescens</i>
24	Montmorency	<i>P. cerasus</i>
25	St. Morello	<i>P. cerasus</i>
26	Compact Stella	<i>P. avium</i>

### Caracterización morfológica

De las veinte accesiones provenientes de la Región del Biobío, se realizó la caracterización morfológica de las hojas en las accesiones enumeradas desde 1 hasta 17, ya que del resto solo se disponía del ADN.

Se recolectaron ramillas de un año de edad y de cada ramilla se tomaron ocho hojas para medir largo de lámina, largo del pecíolo, ancho de lámina y las relaciones entre largo/ancho de lámina y largo lámina/ largo pecíolo, parámetros descritos por la Unión Internacional para la Protección de las Obtenciones Vegetales (UPOV, 2006), donde el número de accesiones por localidad fue de una accesión para Collanco, una accesión para Cato, dos accesiones para Quillón, dos accesiones para Confluencia, dos accesiones para El Sauce, dos accesiones para San Nicolás, dos accesiones para San Carlos y cinco accesiones para San Fabián. (Cuadro 1, accesiones 1 a 17). Se realizó además una caracterización de las hojas basándose en parámetros cualitativos descritos por Faúndez y Bustamante (1990).

## Extracción de ADN

La extracción de ADN fue realizada por duplicado para cada accesión. Se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito por Lodhi *et al.*, (1994) de la siguiente manera: se tomaron aproximadamente 0,1 gramos de brote por accesión, poniendo cada uno en un tubo eppendorf con 700  $\mu\text{L}$  de buffer de extracción, 2 $\mu\text{L}$  de  $\beta$ -mercaptoetanol y 10 mg de polivinilpirrolidona (PVP). Se realizó la trituración con la ayuda de una pequeña bola de acero mediante el uso del robot Mini-Beadbeater<sup>TM</sup> (Biospec Products), durante tres minutos. Se incubó a 60 °C durante 30 minutos. Luego se agregaron 600  $\mu\text{L}$  de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1), mezclando por inversión para centrifugar a 8.000 rpm durante 15 minutos a 4°C. Se transfirió el sobrenadante (450 $\mu\text{L}$ ) a otro tubo en el cual se agregaron 180  $\mu\text{L}$  de NaCl 5M y 900  $\mu\text{L}$  de etanol absoluto a -20°C, mezclando por inversión. Los tubos se mantuvieron en reposo por 30 min a 4°C. Se centrifugaron a 3.000 rpm por 3 minutos y luego a 6.000 rpm por otros 3 minutos. Se descartó el sobrenadante, obteniendo un precipitado el que fue lavado con 500  $\mu\text{L}$  de etanol al 76% centrifugando por 5 minutos a 10.000 rpm, dos veces. Se secó el precipitado utilizando una placa caliente a 60°C por un minuto. El precipitado se resuspendió en 100  $\mu\text{L}$  de agua destilada con 5  $\mu\text{L}$  de RNAsa. Finalmente se incubaron los tubos por 30 minutos a 37°C. La calidad e integridad del ADN extraído se confirmó mediante electroforesis en geles de agarosa al 0,8% con una diferencia de potencial de 100 V en tampón Tris-borato EDTA (TBE) 1X. El tampón TBE se preparó con una solución stock 10X que contiene Tris base 0,9 M; ácido bórico 0,9 M y ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 0,02 M. Posteriormente se llevo a cabo la visualización en un transiluminador de luz UV (Dual Intensity Transiluminator UVP) del ADN teñido con bromuro de etidio (0,25  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de agarosa), capturando la imagen con el software Nikon Capture Control. El ADN extraído fue cuantificado por absorbancia a 260/280 nm en un espectrofotómetro Shimadzu UV-160A UV-visible, utilizando un factor de dilución de 200 y como solvente agua destilada. Mediante dilución en agua destilada se llevo el ADN a una concentración de 5ng $\cdot\mu\text{L}^{-1}$  en un volumen final de 500  $\mu\text{L}$ ., siendo almacenadas estas diluciones a una temperatura de 4°C.

## Microsatélites

Se probaron partidores de SSR desarrollados previamente para diversas especies del género *Prunus*. De un total de 36 partidores se utilizaron 15 (Cuadro 3), descartando los que no presentaron amplificación o fueron poco resolutivos.

Cuadro 3. Lista de partidores del tipo microsátélites utilizados para identificar a la población en estudio. (D=Directo, I=Inverso).

Nombre	Orientación	Secuencia partidior (5'-3')	Origen especie	Referencia
BPPCT009	D	ATTCGGGTCGAACTCCT	Durazno	Dirlewanger <i>et al.</i> , 2002
	I	ACGAGCACTAGAGTAACCCTCTC		
BPPCT018	D	CTCAACTGCTGTCCTCACTTC	Durazno	Dirlewanger <i>et al.</i> , 2002
	I	CATGCTGATCCTAACCCCA		
BPPCT040	D	ATGAGGACGTGTCTGAATGG	Durazno	Dirlewanger <i>et al.</i> , 2002
	I	AGCCAAAACCCCTCTTATACG		
CPPCT6	D	AATTAACCTCCAACAGCTCCA	Durazno	Aranzana <i>et al.</i> , 2002
	I	ATGGTTGCTTAATTCAATGG		
PceGA25	D	GCAATTCGAGCTGTATTTTCAGATG	Guindo	Cantini <i>et al.</i> , 2001
	I	CAGTTGGCGGCTATCATGTCTTAC		
pchms5	D	CGCCCATGACAAACTTA	Durazno	Sosinki <i>et al.</i> , 2000
	I	GTCAAGAGGTACACCAG		
Pchgms6	D	CATTGTTTCATGGGAGGAATT	Durazno	Sosinki <i>et al.</i> , 2000
	I	AGAACATTCCTAAAGGAGCA		
pchgms3	D	ACGCTATGTCCGTACACTCTCCATG	Durazno	Sosinki <i>et al.</i> , 2000
	I	CAACCTGTGATTGCTCTATTAAAC		
PMS3	D	TGGACTTCACTCATTTCAGAGA	Cerezo	Cantini <i>et al.</i> , 2001
	I	ACTGCAGAGAATTTACAACCA		
PMS30	D	CTGTGCGAAAGTTGCGCTATGC	Cerezo	Cantini <i>et al.</i> , 2001
	I	ATGAATGCTGTGTACATGAGGC		
PMS67	D	AGTCTCTCACAGTCAGTTTCT	Cerezo	Cantini <i>et al.</i> , 2001
	I	TTAACTTAACCCCTCTCCCTCC		
Ps12e2	D	GCCACCAATGGTTCTTCC	Cerezo	Kaçar <i>et al.</i> , 2005
	I	AGCACCAGATGCACCTGA		
UDP97-402	D	TCCCATAACCAAAAAAACACC	Durazno	Cipriani <i>et al.</i> , 1999
	I	TGGAGAAGGGTGGGTACTTG		
UDP96-018	D	TTCTAATCTGGGCTATGGCG	Durazno	Cipriani <i>et al.</i> , 1999
	I	GAAGTTCACATTTACGACAGGG		
UDP98-412	D	AGGGAAAGTTTCTGCTGCAC	Durazno	Testolin <i>et al.</i> , 2000
	I	GCTGAAGACGACGATGATGA		

### Amplificación del ADN mediante PCR

La reacción de PCR se realizó en placas PCR, utilizando 4 µL de la dilución de ADN. El programa de amplificación para microsátélites se realizó en termocicladores PTC-100 MJ Research el cual consistió en una desnaturalización inicial a 95 °C durante 7 minutos, seguido por un ciclo de 40 repeticiones de 45 segundos a 94°C, 45 segundos a 56°C y 1 minuto 30 segundos a 72°C y por último una fase de elongación final por 10 min a 72°C.

### Visualización de los productos de amplificación del PCR para microsátélites

Los productos de PCR fueron visualizados mediante electroforesis vertical en gel de poliacrilamida (PAA) desnaturante al 6%. El gel se preparó con 75 mL de una dilución de acrilamida al 6% (bis-acrilamida al 40%, urea 7,5 M y tampón TBE 0,5X), 90 µL de N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina (TEMED) y 180 µL de persulfato de amonio 10%.

La electroforesis de los geles fue realizada en cámaras de electroforesis vertical DNA Sequencing System FB-SEQ-3545 (Fisher Scientific), con tampón TBE 0,5X., durante una hora con cuarenta y cinco minutos a 1.900 V. El proceso de revelado se desarrolló según el protocolo de Chalhoub *et al.*, (1997).

El peso molecular de las bandas amplificadas se calculó utilizando como referencia el marcador 50 pb DNA Gene Ruler Ladder Plus™. Se realizó un análisis de regresión entre el peso molecular de las diferentes bandas del marcador y la distancia de migración del mismo en la electroforesis, generando una ecuación de regresión que fue utilizada para calcular el peso molecular de los alelos identificados en los loci.

### **Análisis Estadístico**

Para determinar diferencias entre localidades, se utilizó un diseño completamente aleatorizado, donde la unidad experimental correspondió a una hoja de ramilla, y se determinaron 8 repeticiones por accesión. Los datos fueron analizados mediante un análisis de varianza (ANDEVA) con 5% de significancia, para determinar diferencias entre localidades. En el caso de existir diferencias significativas entre las localidades y los parámetros medidos, las medias se separaron con la prueba de rango múltiple de TUKEY. Para establecer algún tipo de asociación entre la zona de recolección y las características de las hojas, se realizó un análisis de componentes principales (ACP) que fue complementado con un análisis de conglomerados, el cual permite la formación de grupos asociados. Para todos los análisis se utilizó el programa estadístico INFOSTAT v2013.

Los perfiles de fragmentos de ADN obtenidos fueron evaluados visualmente y se identificaron los alelos presentes en cada genotipo, con el fin de obtener las relaciones de similitud o distancias genéticas entre los genotipos en estudio y de tener una representación gráfica sobre las posibles agrupaciones que estos podrían generar, se construyó una matriz binaria de datos con las bandas obtenidas para los distintos tipos de marcadores, indicando presencia de una banda mediante el número uno (1) y ausencia de banda mediante el número cero (0). Para lograr obtener el agrupamiento jerárquico entre los genotipos, se utilizó el algoritmo del “vecino más cercano” (Saitou y Nei, 1987) a través del programa PAUP (Swofford, 2002). La visualización del árbol de distancias génicas se realizó utilizando el programa TreeView 1.6.6 (Page, 1996). La robustez de cada rama en el dendrograma fue probada realizando una prueba de “bootstrapping” con 1000 pseudoréplicas. El “bootstrapping” es un procedimiento estadístico utilizado para obtener una mejor estimación de la varianza paramétrica de una distribución, que la observada directamente de las muestras originales. Para esto se utilizan pseudoréplicas, es decir, un conjunto de datos creado artificialmente por re-muestreo, del conjunto de datos observados (Kitching *et al.*, 1998).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Caracterización morfológica

Las accesiones enumeradas desde 1 hasta 17 presentaron las siguientes características observadas en la lámina foliar: ápice agudo, nervadura reticulada pinada, margen serrado fino a doble serrado, lámina simple y simétrica, forma general oblanceolada u obovada y una disposición alterna respecto al tallo, características similares a las descritas por Olden y Nybom (1968).

El análisis ANDEVA arrojó diferencias significativas para las características evaluadas en hoja. (Apéndice II, Cuadro 1 y 2). Los promedios de las características medidas en las hojas se encuentran en el Apéndice II, Cuadro 1 y 2. Los valores de longitud de lámina variaron desde  $5,35\pm 0,43$  cm (Accesión 2, Quillón) a  $10,91\pm 1,99$  cm (Accesión 10, San Carlos). El promedio para longitud de lámina fue de  $8,58\pm 1,45$ . Los valores para ancho de lámina fueron desde  $2,08\pm 0,58$  cm (Accesión 2, Quillón) a  $5,04\pm 0,30$  cm (Accesión 16, San Fabián). El promedio para ancho de lámina fue de  $3,65\pm 0,73$  cm. Los valores para longitud de pecíolo varían desde  $1,10\pm 0,18$  cm (Accesión 2, Quillón) a  $2,36\pm 0,28$  cm (Accesión 14, San Fabián). El promedio para longitud de pecíolo fue de  $1,74\pm 0,35$  cm. La accesión número 2 presentó los menores valores para estos tres parámetros, seguida por la accesión 8, San Nicolás (Apéndice II, Cuadro 1)

Los valores para el índice longitud lámina/ancho lámina varían desde  $1,83\pm 0,15$  cm (Accesión 15, San Fabián) a  $2,78\pm 0,88$  cm (Accesión 2, Quillón). El promedio para este índice fue  $2,41\pm 0,28$  cm. Los valores para longitud lámina/longitud pecíolo varían desde  $3,55\pm 0,77$  cm (Accesión 14, San Fabián) a  $6,89\pm 0,61$  cm (Accesión 11, San Carlos). El promedio para el índice longitud lámina/longitud pecíolo fue de  $5,18\pm 0,89$  cm. (Apéndice II, Cuadro 2)

Pérez-Sánchez *et al.*, (2008) caracterizaron selecciones locales de guindo originarios de España, obteniendo para longitud de lámina foliar entre  $8,96\pm 0,82$  a  $11,19\pm 1,77$  cm, ancho de la lámina foliar entre  $4,47\pm 0,47$  a  $6,78\pm 0,43$  cm, largo del pecíolo valores entre  $2,06\pm 0,34$  a  $3,89\pm 0,69$  cm y largo/ancho de la lámina foliar entre  $1,63\pm 0,11$  a  $2,11\pm 0,13$ . Los guindos evaluados presentaron valores menores para estos parámetros en comparación con los guindos de España.

El análisis de componentes principales (Figura 1) explicó el 91,2% de la variabilidad total. La componente principal 1 (CP1) explica el 54,6% de la variabilidad y las variables que más aportan a su conformación son longitud de pecíolo (0,56) y ancho de lámina (0,54). La segunda componente principal (CP2) explica el 36,6% de la variabilidad, siendo las variables que aportan a su conformación, el índice longitud de lámina/longitud de pecíolo (0,66) y longitud de lámina (0,62) (Apéndice III, Cuadro 1).

Las variables longitud de lámina, ancho de lámina y longitud de pecíolo se correlacionan positivamente entre sí. La mayor correlación se presentó entre las variables longitud de lámina y ancho de lámina ( $r = 0,78$ ). Las variables ancho de lámina y longitud de pecíolo también presentaron una alta correlación ( $r = 0,69$ ). El índice longitud de lámina/ancho de lámina se correlacionó negativamente con longitud de pecíolo ( $r = -0,65$ ) y ancho de lámina ( $r = -0,64$ ) (Apéndice III, Cuadro 2).

El análisis de conglomerados (Apéndice IV) estableció seis agrupaciones las cuales se indican en la Figura 1. Las agrupaciones varían en cuanto a las zonas de recolección por lo que no se puede establecer una asociación determinada entre las accesiones correspondientes a una misma zona y las variables medidas para este análisis. La presencia de sub-poblaciones indicaría que existe diversidad para los datos morfológicos medidos en las hojas.

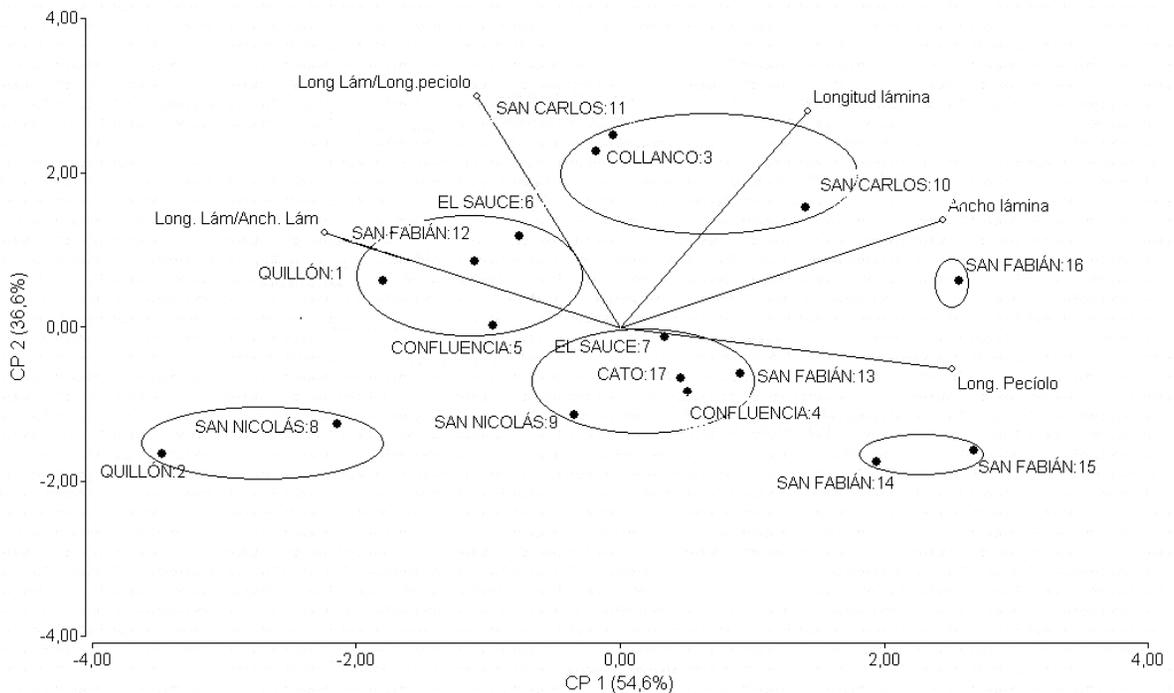


Figura 1. Representación gráfica del análisis de componentes principales para las variables medidas en hojas en las 17 accesiones donde se indica la zona de recolección y el número de accesión correspondiente. Las zonas encerradas representan los grupos asociados mediante análisis de conglomerados.

### Análisis extracción ADN

El sustrato para el análisis genético es el ADN purificado de cada muestra. Al respecto, se apreciaron tres situaciones al analizar cada muestra por electroforesis y tinción fluorescente: ausencia total de bandas fluorescentes, bandas muy tenues y bandas con bastante fluorescencia. Las muestras sin señal fueron descartadas ya que indicarían ausencia de ADN. Los carriles 2, 5, 6, 7, 8, 9 y 10 (Figura 2) presentaron bandas con baja o casi nula señal fluorescente, lo cual daría indicios de menores concentraciones de ADN si se comparan con los carriles que presentaron señal intensa. Estos carriles efectivamente mostraron concentraciones desde los 60 a 120  $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$  de ADN mientras que los carriles 1, 3, 4, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 y 26 (Figura 2 y 3, Apéndice V) presentaron concentraciones de ADN desde los 180 a 1.930  $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$  ADN y fueron más luminosos en el gel de agarosa.

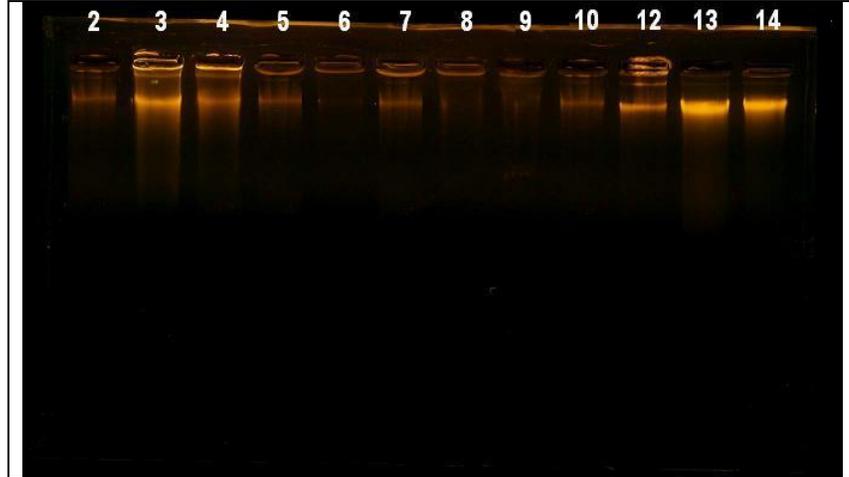


Figura 2. Electroforesis en gel de agarosa con las muestras que presentaron una fluorescencia variada. Los números corresponden a las accesiones evaluadas en este estudio.

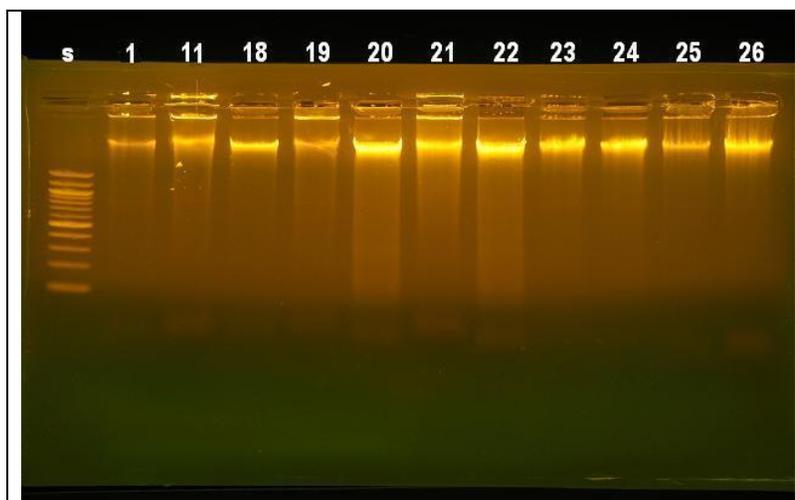


Figura 3. Electroforesis en gel de agarosa con las muestras que presentaron las mayores concentraciones de ADN así como también de mejor calidad (s= estándar 100 pb). Los números corresponden a las accesiones evaluadas en este estudio.

En general las muestras corridas en el gel de agarosa presentaron nula a muy baja presencia de “barrido”, apuntando a que no hubo o fue muy poca la degradación del ADN, lo cual sugiere una obtención de ADN de calidad apropiada. Los cuocientes entre las absorbancias a 260 y 280 nm (Apéndice V), presentan valores entre 1,40 a 1,95, considerados indicadores de pureza de ADN adecuados. De las 26 extracciones solo seis se encontraron bajo 1,7 y el resto se aproximó a este valor o se encontraron dentro del rango definido para un ADN sin mayores contaminantes, como lo reportado por Dixit (1998) quién obtuvo valores entre 1,69 a 1,85 indicando niveles insignificantes de contaminación por proteínas o polisacáridos. Las muestras con mayores concentraciones de ADN también fueron las que presentaron ADN de mejor calidad; esto se debería a que el material vegetal del cual se realizó la extracción correspondía a brotes tiernos y de mejor conservación. Lodhi *et al.*, (1994) señalaron la importancia de la etapa de desarrollo de la planta para el momento de recolección del material, indicando que el momento óptimo para la recolección de la hoja es durante el período de brotación activa, ya que más tarde en la temporada la extracción de ADN fue difícil y el ADN obtenido fue inestable para almacenamiento a largo plazo.

### Microsatélites

De los 36 partidores SSR probados, 29 pertenecían a durazno y de estos el 34,4% amplificó en los guindos evaluados. Los siete partidores restantes fueron aislados de cerezos o guindos y de estos el 71,4% amplificó, obteniendo un total de 15 SSR cuya amplificación fue exitosa. Aunque el número de SSR que arrojaron bandas de calidad fue menos de la mitad del total de los que fueron probados, si permitió demostrar la utilidad que tienen estos marcadores moleculares en especies relacionadas. Wünsch y Hormaza (2002) a partir de la realización de una caracterización molecular de cerezos utilizando SSR secuenciados a

partir de duraznos, señalaron la eficiencia de estos marcadores moleculares y la posibilidad que estos ofrecen para ser utilizados en diferentes especies del género, permitiendo además superar el complejo proceso de desarrollo de SSR.

Los SSR aislados de cerezos o guindos, a pesar de ser menor cantidad, fueron los más efectivos. Wang *et al.*, (2012) explican que el éxito de la amplificación utilizando SSRs depende de la distancia filogenética entre la especie original del aislamiento del partidor y la especie en estudio. En general, la disminución del éxito de la amplificación conlleva una mayor distancia genética. Las principales especies cultivadas de *Prunus* pertenecen a tres subgéneros: *Amygdalus* (duraznos y almendros), *Prunophora* (ciruelos y damascos) y *Cerasus* (cerezos y guindos), siendo este último subgénero el que se separó más temprano de las especies ancestrales de *Prunus*, según lo señalado por Wünsch y Hormaza (2002).

El tamaño de los alelos identificados fue desde 96 pb (UDP98-412) a 287 pb (pchcms5). El número de alelos amplificados por *locus* para cada accesión fue de dos a cuatro (Cuadro 4). Cantini *et al.*, (2001) indicaron que cuatro es el máximo número de bandas amplificadas que se espera, lo que corresponde a la condición de máxima heterocigosidad para un locus en una especie tetraploide. Los marcadores BPPCT040 y UDP98-412 fueron los que amplificaron mayor número de bandas en una accesión, ambos desarrollados a partir de durazno. Downey e Iezzoni (2000) utilizaron SSR de cerezo, durazno y guindo en *P. serotina* (cerezo negro), siendo el más informativo un partidor aislado de durazno, el cual incluso logró identificar a los individuos tetra-alélicos indicando que no solo la distancia genética de las especies a través de la filogenia influiría en la amplificación sino que dentro del género *Prunus* también influye la naturaleza del propio partidor.

Cuadro 4. Tamaño de los alelos generados con los 15 partidores en las 20 accesiones de guindos.

Partidor de microsatélite	Nº de alelos amplificados	Tamaño de los alelos
		pb (pares de bases)
BPPCT009	3	169 - 192 - 195
BPPCT018	2	221 - 223
BPPCT040	4	143 - 147 - 149 - 158
CPPCT6	3	197 - 203 - 210
PceGA25	2	178 - 206
pchcms5	2	273 - 287
Pchgms6	2	170 - 177
pchpgms3	3	193 - 200 - 207
PMS3	3	165 - 212 - 229
PMS30	2	121 - 135
PMS67	3	164 - 166 - 170
Ps12e2	3	173 - 176 - 190
UDP97-402	3	126 - 139 - 157
UDP96-018	2	259 - 261
UDP98-412	4	96 - 98 - 115 - 117

### Diversidad genética

Los 15 marcadores SSR presentaron bandas monomórficas en las 20 accesiones de guindos, como lo ilustra la Figura 4. Mediante la matriz binaria de ausencia/presencia de alelos el dendrograma de la Figura 5 muestra la agrupación única de los 20 guindos, es decir, no se presentaron diferencias entre ellos. Los guindos de este estudio se encuentran separados de las variedades de guindos y de los portainjertos híbridos utilizados como referencia en este trabajo. La validez de los grupos principales se confirmó con valores de “bootstrapping” sobre 60% y de un 100% para la rama que separa a las 20 accesiones de guindos recolectados del resto de las muestras utilizadas.

Kaçar *et al.*, (2005) identificaron 10 ejemplares de cerezos con 13 SSR, que fueron separados en dos grupos. Ercisli *et al.*, (2011) estudiaron la diversidad genética de 18 accesiones de cerezos silvestres de Turquía utilizando 10 SSR, obteniendo siete grupos principales. Xuan *et al.*, (2009) evaluaron el polimorfismo de 30 accesiones de guindos con 15 SSR obteniendo resultados satisfactorios, mientras que Lacis *et al.*, (2009) evaluaron la diversidad genética de 126 genotipos provenientes de Letonia y Suecia con sólo tres SSR. Estas investigaciones demostrarían que el número de SSR que se necesita para establecer diferencias en un conjunto de genotipos es muy variado; en el caso de este estudio 15 SSR para caracterizar 20 accesiones resultaron una cantidad apropiada.

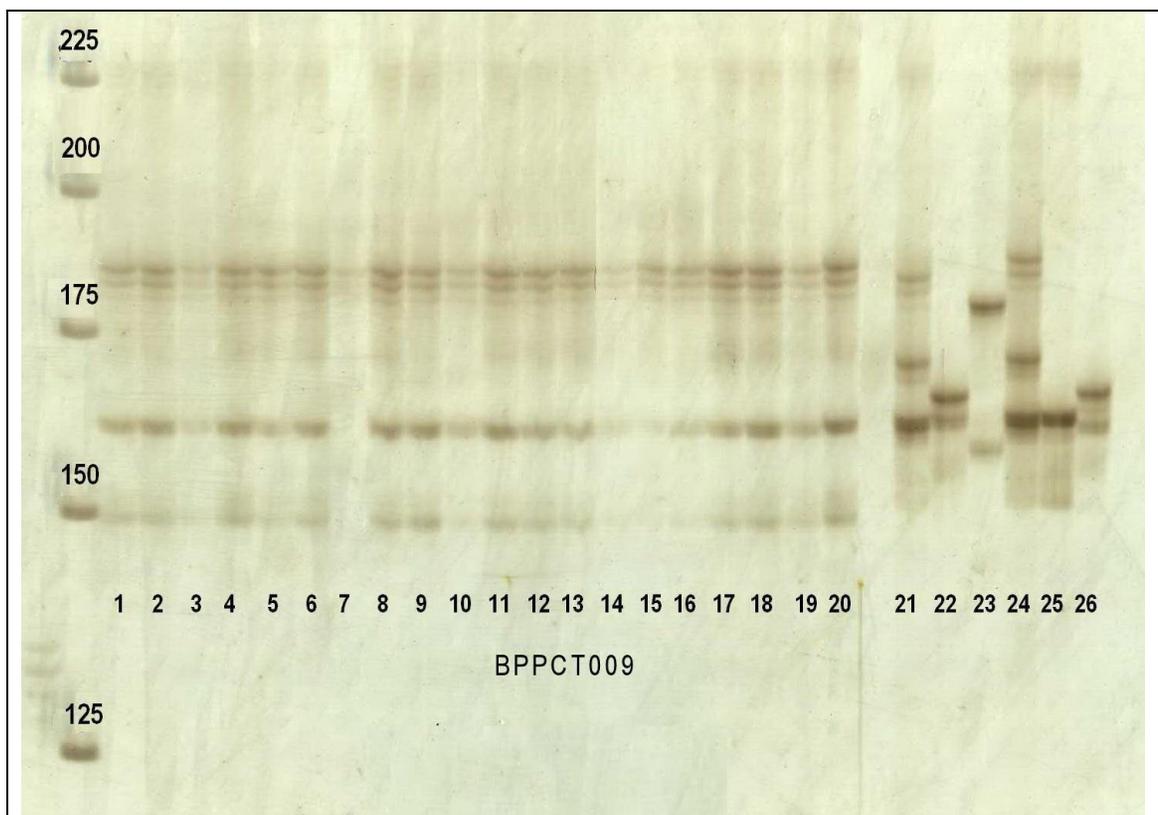


Figura 4. Electroforesis en gel de poliacrilamida donde se observa la uniformidad en la amplificación de los alelos con el partidor de microsatélite BPPCT009 para las 20 accesiones estudiadas (carriles 1-20). Los carriles 21 a 26 corresponden a (21) 'CAB-6P', (22) 'Can Index', (23) 'Gisela 5', (24) 'Montmorency', (25) 'St. Morello' y (26) 'Compact Stella'.

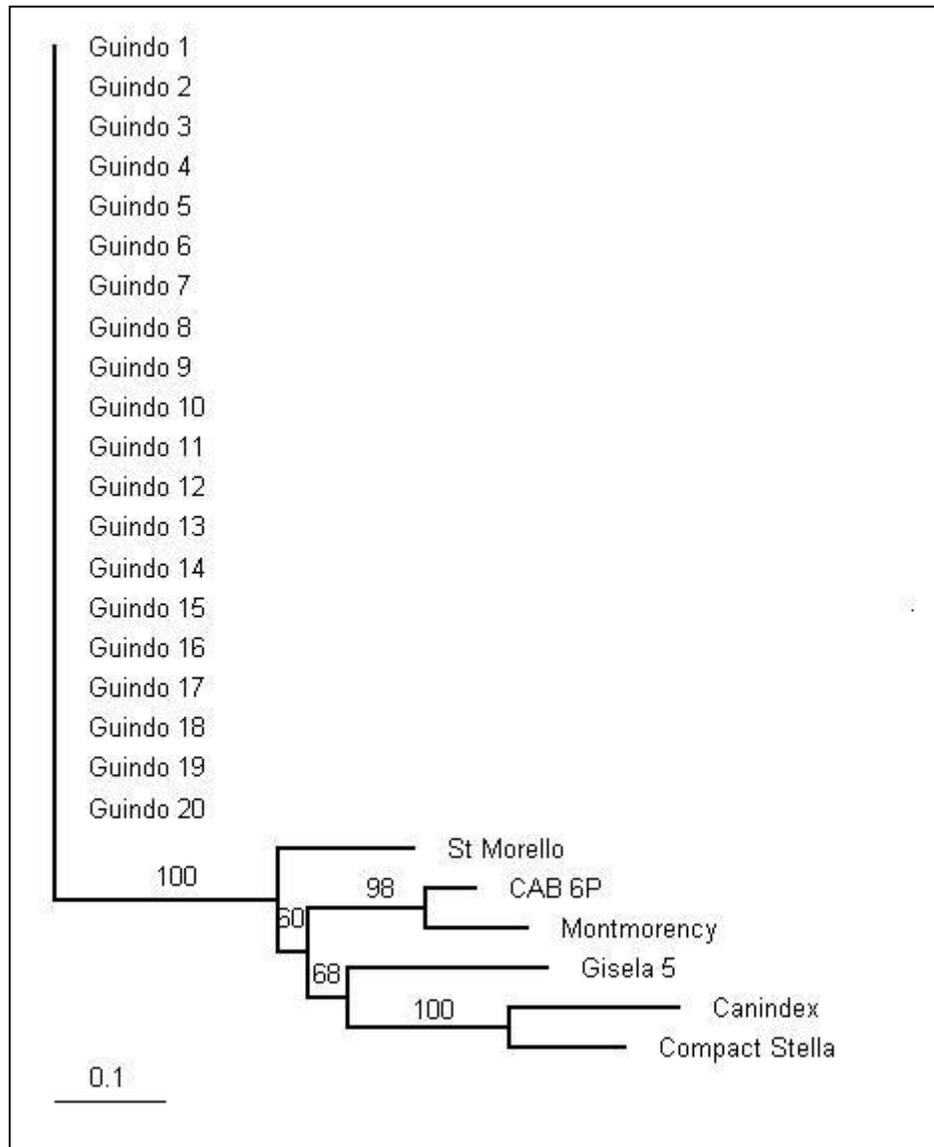


Figura 5. Árbol de diversidad genética de las accesiones en estudio con los valores de “bootstrapping” para cada rama.

La caracterización morfológica indicó diferencias entre las accesiones de guindo, no así la evaluación mediante SSR. Ercisli *et al.*, (2011), aun cuando encontraron amplia diversidad genética basada en marcadores de microsatélites (SSR), en la mayoría de los casos los cerezos pertenecientes a uno de los siete grupos identificados con SSR no presentaban similitudes morfológicas, atribuyendo la variación morfológica a los efectos del medio ambiente, del microclima y de las prácticas culturales.

La presencia de virus puede ser uno de los factores responsables de la heterogeneidad de los huertos de cerezos injertados sobre guindos, ya que según un trabajo realizado en

paralelo con el fin de sanear las accesiones 3348 y 3359 (accesiones 18 y 19 respectivamente, Cuadro 1), éstas mostraron un estatus sanitario deficiente, ambas con presencia de *Prunus dwarf virus* (PDV), *Cherry green ring mottle virus* (CGRMV) y *Cherry virus A* (CVA) (Fontán, 2010).

El cultivo tanto de guindos como de cerezos comenzó en América con la llegada de los primeros colonos y se extendió a lo largo del continente (Faust y Suranyi, 1997), sin embargo, se desconoce el origen de los guindos en Chile. Según el Dr. Carlos Muñoz<sup>1</sup>, los guindos en Chile habrían sido propagados a las regiones cercanas desde Angol, Región de la Araucanía, por el vivero El Vergel y pertenecían a la variedad ‘Montmorency’, originada en Francia (Cantini *et al.*, 2001). Faust y Suranyi (1997) en su publicación señalan que Duhamel en 1768 describió a dicha variedad como el primer guindo en ser ampliamente cultivado en Europa, sobretodo por los franceses debido a que se originó en el valle de dicho nombre en Francia antes del siglo XVII probablemente como una semilla del llamado “Cerise Hâtive” o “Cerise Commune”. No se sabe cuándo ‘Montmorency’ llegó a América pero se estima que lo hizo con los primeros colonos, y pronto se hizo muy popular como frutal y comenzó a propagarse a lo largo de la región, llegando a ser la variedad más predominante de guindo en Norteamérica.

Sin embargo, según el dendrograma de diversidad genética obtenido en base a los patrones de alelos de SSR obtenidos en esta memoria, las accesiones de guindo estudiadas se encuentran separadas de ‘Montmorency’ y forman un grupo distinto que no pertenece ni se relaciona con ningún otro dentro del dendrograma. Según Pederson (2006) es posible que la diferencia genética desarrollada entre clones de la misma variedad o selección, ocurra debido a la acumulación de mutaciones somáticas en el tiempo y a través de la selección por propagadores de las características que buscan ser mejoradas, como la adaptación al clima y las condiciones del suelo, así como también algunas características fenotípicas. Esto puede generar la existencia de líneas genéticamente diferentes aunque sean consideradas como de la misma variedad. Es probable que las accesiones de guindos se diferenciaron al adaptarse a las condiciones que presentan las regiones donde se encuentran, sin embargo el nivel de diferencias genéticas detectada entre las 19 accesiones de guindos en comparación con los genotipos de referencia, demuestran que éste no sería el caso, tratándose más bien de un genotipo diferente hasta ahora no identificado. Teillier *et al.*, (2003) señalan que varias especies cultivadas de Rosáceas pueden encontrarse actualmente en estado silvestre, especialmente en las regiones con clima más frío como las IX-XII, entre ellas se encontraría *P. cerasus*. Se consideran como alóctonas o asilvestradas, aquellas especies que han sido introducidas y posteriormente se vuelven silvestres.

La caracterización molecular de especies vegetales utilizadas ya sea como variedades o patrones es de gran importancia para los fitomejoradores, para el desarrollo de bancos de germoplasma y para el sector comercial. Esta herramienta permite facilitar la identificación de cualquier variedad y el control de su propagación, así como también la posibilidad de

---

<sup>1</sup> Carlos Muñoz. Profesor Titular, Universidad de Chile, Departamento Producción Agrícola, 2014. (Comunicación personal)

estudiar la diversidad genética entre variedades y poblaciones diferentes. A su vez, trae consigo beneficios en los programas de mejoramiento de guindos y cerezos, contribuyendo a la toma de decisiones, por ejemplo, en los genotipos utilizados como parentales para cruzamientos y manejo de germoplasma para maximizar o conservar la diversidad, la cual ha disminuido progresivamente en las especies cultivadas, haciendo aún más importante la conservación de las poblaciones silvestres (Wünsch y Hormaza, 2002).

## CONCLUSIONES

Las accesiones de guindo recolectadas en la Región del Biobío para este trabajo presentan diferencias fenotípicas observadas en hojas.

Las accesiones de guindo recolectadas en la Región del Biobío, no presentan diversidad genética al ser evaluadas con 15 partidores microsatélites desarrollados para el género *Prunus*. Los resultados obtenidos del dendrograma indican que las accesiones estudiadas no corresponden a ninguno de los genotipos usados como referencia, formando un grupo de origen desconocido.

**BIBLIOGRAFÍA**

- Ahmad R.; D. Potter and S. M. Southwick. 2004. Identification and characterization of plum and pluot cultivars by microsatellite markers. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 79(1): 164-169.
- Aranzana, M.J.; J. García-Mas; J. Carbó and P. Arús. 2002. Development and variability analysis of microsatellite markers in peach. *Plant Breeding*. 121 (1) :87-92.
- Chalhoub, B.A.; S. Thibault; V. Laucou; H. Hofte and R. Cousin. 1997. Silver staining and recovery of AFLP amplification products on large denaturing polyacrylamide gels. *BioTechniques* 22 (2): 216-220.
- Cantini, C.; A. F. Iezzoni; W. F. Lamboy; M. Baitzki and D. Struss. 2001. DNA fingerprinting of tetraploid cherry germplasm using simple sequence repeats. *Journal of the American Society of Horticultural Science*. 126:205-209.
- Carrasco, O. 2000. Portainjertos para cerezos. *Revista Frutícola*. 21(2):47-59.
- Cipriani G.; G. Lot; W-G. Huang; MT. Marrazo; E. Peterlunger and R. Testolin . 1999. AC/GT and AG/CT microsatellite repeats in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch]: isolation, characterization and cross-species amplification in *Prunus*. *Theoretical and Applied Genetics* 99:65–72.
- Claverie 2001. Actualización comercial, variedades, portainjertos y sistemas de conducción. Corporación Pomanova Seminario Internacional de Cerezos. Disponible en: [http://www.viverosur.com/POMANOVA/Seminario\\_Cerezos\\_2001.pdf](http://www.viverosur.com/POMANOVA/Seminario_Cerezos_2001.pdf) Leído el 23 de Noviembre 2008
- Cruz, M. 2001. Riesgos del uso de patrones silvestres y francos en cerezo. *Boletín Informativo INIA Quilamapu*. Disponible en: <http://www.inia.cl/medios/quilamapu/pdf/informativos/info52.pdf>. Leído el 23 de Noviembre 2008.
- Dirlewanger, E.; P. Cosson; M. Tavaud; M. J. Aranzana; C. Poizat; A. Zanetto; P. Arús and F. Laigret. 2002. Development of microsatellite markers in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch] and their use in genetic diversity analysis in peach and sweet cherry (*Prunus avium* L.). *Theoretical Applied Genetics*. 105: 127–138
- Dixit, A. 1998. A simple and rapid procedure for isolation of Amaranthus DNA suitable for fingerprint analysis. *Plant Molecular Reporter* 16: 1-8.

- Downey, S.L. and A. F. Iezzoni. 2000. Polymorphic DNA markers in black cherry (*Prunus serotina*) are identified using sequences from sweet cherry, peach and sour cherry. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 125: 76-80.
- Ercisli, S.; G. Agar; N. Yildirim; B. Duralija; A. Vokurka and H. Karlidag. 2011. Genetic diversity in wild sweet cherries (*Prunus avium*) in Turkey revealed by SSR markers. *Genetics and Molecular Research*. 10 (2):1211-1219.
- Faúndez, L. y R. Bustamante. 1990. *Morfología Vegetal*. Publicación Docente N°3 Dirección Escuela de Agronomía. Universidad de Chile.
- Faust, M. and D. Surányi. 1997. Origin and dissemination of cherry. *Horticultural Reviews*. 19: 263-317.
- Fontán, F. 2010. Saneamiento de selecciones de guindo (*Prunus cerasus* L.) usadas como patrones de cerezo en la VIII Región. Magíster en Ciencias Agropecuarias, Mención Producción Frutícola. Santiago, Chile: Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile. 43 p.
- Hancock, A. M. and A.F. Iezzoni. 1988. Malate dehydrogenase isozyme patterns in seven *Prunus* species. *Hortscience* 23:381–383.
- Kaçar, Y.; A. F. Iezzoni and S. Cetiner. 2005. Sweet cherry cultivar identification by using SSR markers. *Journal of Biological Sciences*. 5(5): 616-619.
- Kalia, R.K.; M. K. Rai; S. Kalia; R. Sinhg and A. K. Dhawan. (2011). Microsatellite markers: an overview of the recent progress in plants. *Euphytica* 177: 309-334.
- Kitching, I.; P. L.. Forey; C.J. Humphries and D. M. Williams. 1998. *Cladistics: The theory and practice of parsimony analysis*. 2ª edición. Oxford University Press. Great Clarendon Street. Oxford, New York.
- Lacis, G.; I. Rashal; S.Ruisa; V. Trajkovski and A. Iezzoni. 2009. Assessment of genetic diversity of Latvian and Swedish sweet cherry (*Prunus avium* L.) genetic resources collections by using SSR (microsatellite) markers. *Scientia Horticulturae* 121:451–457.
- Lodhi, M.; G-N. Ye; N. F. Weeden and B. I. Reisch. 1994. A simple and efficient method for DNA extraction from grapevine cultivars, *Vitis* species and *Ampelopsis*. *Plant Molecular Biology Reporter*. 12(1): 6-13.
- Loreti, F y G. Gil. 1993. Los portainjertos del ciruelo y del cerezo: Presente y Futuro. *Revista Frutícola*. 14(3):103-111.

- Mnejja, M.; J. García-Mas; J-M. Audergon and P. Arús. (2010). *Prunus* microsatellite marker transferability across rosaceous crops. *Tree Genetics & Genomes* 6: 689-700.
- Moreno J. y M. A. Manzano. 2002. Variedades de cerezo para el Valle del Jerte. Consejería de Agricultura y Medio Ambiente, Junta de Extremadura, Badajoz, España. 78 pp.
- Olden, E.J. and N. Nybom. 1968. On the origin of *Prunus cerasus* L. *Hereditas*. 69:327–345.
- Page, R. D. M. 1996. TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Cabios* 12(4): 357-358.
- Pederson, B.H. 2006. DNA fingerprints of 51 sweet and sour *Prunus* accessions using Simple Sequence Repeats. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 81(1): 118-124.
- Pérez Sánchez, R.; M.A. Gómez Sánchez and R. Morales-Corts. 2008. Agromorphological characterization of traditional Spanish sweet cherry (*Prunus avium* L.), sour cherry (*Prunus cerasus* L.) and duke cherry (*Prunus x gondouinii* Rehd.) cultivars. *Spanish Journal of Agricultural Research*. 6(1): 42-55
- Rehder, A. 1947. Manual of cultivated trees and shrubs. The Macmillan Company, New York.
- Saitou, N and M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4:406-425.
- Santi, F and M. Lemoine. 1990. Genetic markers for *Prunus avium* L. 2: inheritance and linkage of isozyme loci. *Annals of Forest Science* 47: 219-227.
- Schuster, M and H, Schreiber. 2000. Genome investigation in sour cherry, *P. cerasus* L. *Acta Horticulture* 538: 375–379.
- Sosinski, B.; M. Gannavarapu; L. D. Hage; E. Beck; G. J. King; C.D.S Ryder; S. Rajapakse; W. Y. Baird; R.E. Ballard and A. G. Abbott. 2000. Characterization of microsatellite markers in peach (*Prunus persica* (L.) Batsh). *Theoretical and Applied Genetics*. 101: 421-428.
- Swofford, D. L. 2002. PAUP\* 4.0 Phylogenetic analysis using parsimony (\*and other methods). Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Tavaud, M.; A. Zanetto; J. L. David; F. Laigret and E. Dirlewanger. 2004. Genetic relationships between diploid and allotetraploid cherry species (*Prunus avium*, *Prunus* × *gondouinii* and *Prunus cerasus*). *Heredity*. 93:631–638.

Teillier, S.; R. Rodríguez y M. T. Serra. 2003. Lista preliminar de plantas leñosas, alóctonas, asilvestradas en Chile Continental. Chloris Chilensis. Año 6 N° 2. Disponible en <http://www.chlorischile.cl>. Leído el 15 julio 2010.

Testolin, R.; M. T. Marrazo; G. Cipriani; R. Quarta; I. Verde; M. T. Dettori; M. Pancaldi and S. Sansavini. 2000. Microsatellite DNA in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch] and its use in fingerprinting and testing the genetic origin of cultivars. *Genome* 43: 512–520.

UPOV. 2006. Guidelines for the conduct of tests for distinctness, homogeneity and stability of the sour and duke cherry. 35 p. International Union for the Protection of New Varieties of Plants, Genova, Italy.

Valenzuela, L. 1998. El cultivo del cerezo en Chile; aspectos técnicos. *Revista Frutícola* 19(2): 55-68.

Wang, H.; J. A. Walla; S. Zhong; D. Huang; W. Dai. (2012). Development and cross-species/genera transferability of microsatellite markers discovered using 454 genome sequencing in chokecherry (*Prunus virginiana* L.). *Plant Cell Reports* 31: 2047-2055.

Waugh, R. and W. Powell. 1992. Using RAPD markers for crop improvement. *Trends in Biotechnology* 10: 186-191.

Wünsch, A. and J. I. Hormaza. 2002. Cultivar identification and genetic fingerprinting of temperate fruit tree species using DNA markers. *Euphytica* 125: 56-67.

Xuan H.; R. Wang; M. Buchele and O. Moller . 2009. Microsatellite markers (SSR) as a tool to assist in identification of sweet (*Prunus avium*) and sour cherry (*Prunus cerasus*). *Acta Horticulturae*. 839: 507-514

## APÉNDICES

**Apéndice I.** Mapa de la Región del Biobío. Los círculos corresponden a las zonas de recolección de los guindos.



Fuente: Página web <https://maps.google.cl/maps?hl=es&mid=1394676690>

**Apéndice II.** Mediciones realizadas en las hojas de 17 accesiones de guindo, para el análisis morfológico.

Cuadro 1. Promedio y desviación estándar de los parámetros de longitud de lámina, ancho de lámina y longitud de pecíolo medidas en las 17 accesiones de guindos recolectadas en la Región del Biobío

N° Accesión	Zona de recolección	Cm					
		Longitud de lámina		Ancho de lámina		Longitud pecíolo	
1	Quillón	8,39±0,75	cd	3,04±0,32	abc	1,44±0,11	ab
2	Quillón	5,35±0,43	a	2,08±0,58	a	1,10±0,18	a
3	Collanco	10,61±1,12	ef	4,05±0,55	defg	1,65±0,19	abcd
4	Confluencia	8,11±1,91	bcd	3,56±0,61	bcdefg	1,91±0,54	bcde
5	Confluencia	8,25±0,98	bcd	3,24±0,39	bcd	1,56±0,16	Abc
6	El Sauce	9,63±1,15	def	3,50±0,59	bcdef	1,69±0,18	abcd
7	El Sauce	8,40±1,01	cd	3,86±0,35	cdefg	1,65±0,41	abcd
8	San Nicolás	6,24±0,60	ab	2,59±0,29	ab	1,21±0,15	a
9	San Nicolás	7,48±0,90	bc	3,24±0,55	bcd	1,70±0,33	abcd
10	San Carlos	10,91±1,99	ef	4,49±0,61	gh	2,00±0,28	bcde
11	San Carlos	10,50±0,93	cde	4,28±0,64	efgh	1,53±0,07	abc
12	San Fabián	8,80±0,85	cde	3,39±0,32	bcde	1,49±0,16	ab
13	San Fabián	8,18±1,04	bcd	4,01±1,17	cdefg	1,95±0,66	bcde
14	San Fabián	8,24±1,20	bcd	3,84±0,39	cdefg	2,36±0,28	e
15	San Fabián	8,21±1,46	bcd	4,46±0,62	fgh	2,21±0,38	de
16	San Fabián	9,81±0,94	def	5,04±0,30	h	2,04±0,65	bcde
17	Cato	8,71±0,97	cde	3,43±0,47	bcde	2,15±0,55	cde
Promedio		8,58±1,45		3,65±0,73		1,74±0,35	

(Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas entre accesiones ( $p < 0,05$ ))

Cuadro 2. Promedios y desviación estándar de los índices medidos en las 17 accesiones de guindos recolectadas en la Región del Biobío.

N° Accesión	Zona de recolección	Longitud lámina/Ancho lámina		Longitud lámina/Longitud pecíolo	
1	Quillón	2,77 ± 0,12	c	5,85±0,50	cde
2	Quillón	2,78±0,88	c	4,92±0,53	abcde
3	Collanco	2,64±0,24	c	6,52±1,14	de
4	Confluencia	2,26±0,23	abc	4,65±1,95	abcde
5	Confluencia	2,56±0,19	bc	5,35±0,98	abcde
6	El Sauce	2,77±0,18	c	5,76±0,92	cde
7	El Sauce	2,20±0,37	abc	5,24±0,80	abcde
8	San Nicolás	2,42±0,13	abc	5,18±0,54	abcde
9	San Nicolás	2,36±0,41	abc	4,57±1,11	abcd
10	San Carlos	2,42±0,22	abc	5,57±1,34	bcde
11	San Carlos	2,48±0,22	abc	6,89±0,61	e
12	San Fabián	2,60±0,15	ac	5,99±0,98	cde
13	San Fabián	2,26±0,90	abc	4,69±1,75	abcd
14	San Fabián	2,16±0,31	abc	3,55±0,77	a
15	San Fabián	1,83±0,15	a	3,74±0,56	ab
16	San Fabián	1,95±0,14	ab	5,24±1,73	abcde
17	Cato	2,57±0,31	ac	4,33±1,34	abc
Promedio		2,41±0,28		5,18±0,89	

(Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas entre accesiones ( $p < 0,05$ ))

**Apéndice III.** Datos análisis de componentes principales.

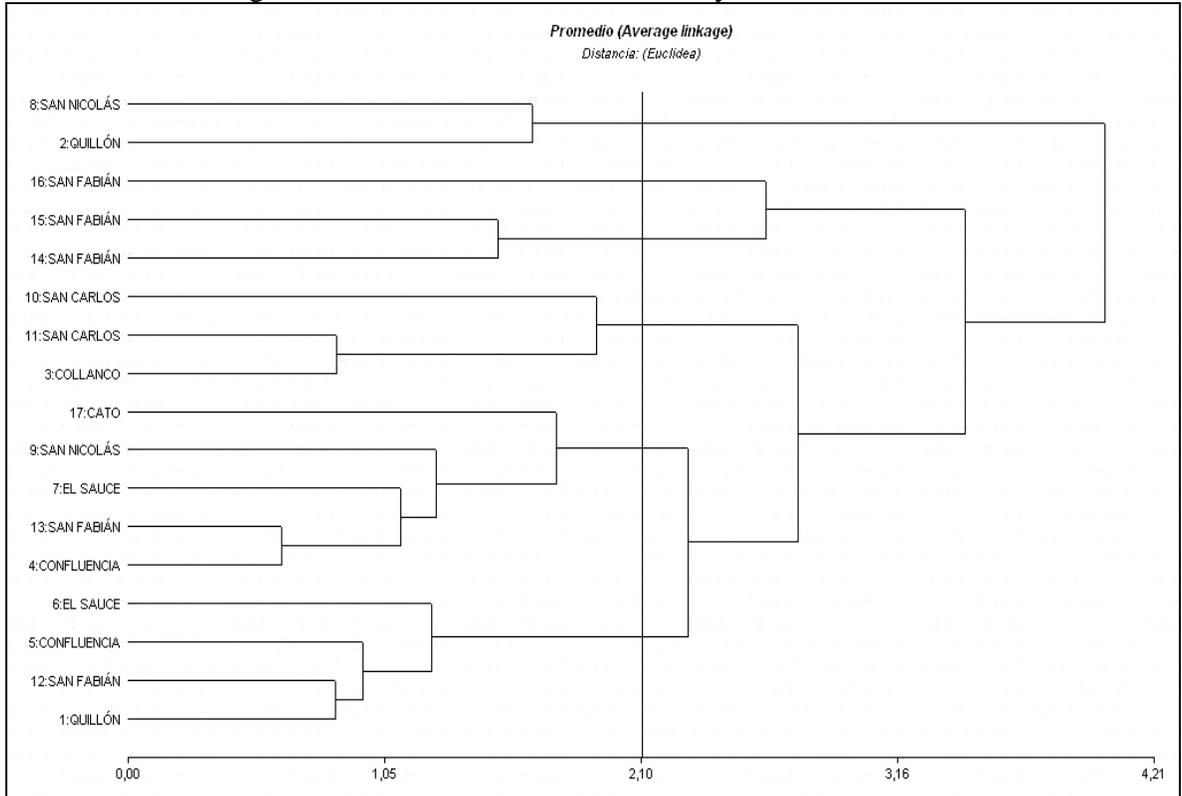
Cuadro 1. Coeficientes de autovectores para las 17 accesiones recolectadas en la Región del Biobío. Ponderación de cada variable en la formación de CP1 y CP2.

Variables	CP 1	CP 2
Longitud de lámina	0,31	0,62
Ancho de lámina	0,54	0,31
Longitud de pecíolo	0,56	-0,12
Longitud de lámina/Ancho de lámina	-0,49	0,27
Longitud de lámina/Longitud de pecíolo	-0,24	0,66

Cuadro 2. Matriz de correlaciones análisis de componentes principales

	Longitud de lámina	Ancho de lámina	Longitud de pecíolo	Longitud de lámina/Ancho de lámina	Longitud de lámina/Longitud de pecíolo
Longitud de lámina	1,0				
Ancho de lámina	0,78	1,0			
Longitud de pecíolo	0,40	0,69	1,0		
Longitud de lámina/Ancho de lámina	-0,05	-0,64	-0,65	1,0	
Longitud de lámina/Longitud de pecíolo	0,51	0,05	-0,58	0,56	1,00

**Apéndice IV.** Análisis de conglomerados para las diecisiete accesiones evaluadas en el análisis morfológico, indicando número de accesión y zona de recolección.



(Línea de referencia al 50% de la distancia máxima.)

**Apéndice V.** Valores de absorbancias de ADN a 260 nm ( $A_{260}$ ) y a 280 nm ( $A_{280}$ ), cuocientes entre absorbancias ( $A_{260}/A_{280}$ ) y concentraciones de ADN ( $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ ).

N° Accesión	Valores de absorbancia (A)			Concentración ADN
	$A_{260}$	$A_{280}$	$A_{260}/A_{280}$	$\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$
1	0,1300	0,0770	1,69	1.300
2	0,0070	0,0050	1,40	70
3	0,0850	0,0450	1,89	850
4	0,0570	0,0340	1,68	570
5	0,0120	0,0072	1,67	120
6	0,0098	0,0059	1,66	98
7	0,0083	0,0049	1,70	83,10
8	0,0060	0,0041	1,46	60
9	0,0090	0,0060	1,50	90
10	0,0100	0,0066	1,52	100
11	0,1370	0,0700	1,96	1.370
12	0,0370	0,0210	1,76	370
13	0,0950	0,0490	1,94	950
14	0,1200	0,0700	1,71	1.200
15	0,1320	0,0800	1,65	1.320
16	0,0180	0,0120	1,50	180
17	0,0200	0,0120	1,67	200
18	0,1200	0,0650	1,85	1.200
19	0,0900	0,0520	1,73	900
20	0,0930	0,0500	1,86	930
21	0,0850	0,0460	1,85	850
22	0,1950	0,1000	1,95	1.950
23	0,1100	0,0600	1,83	1.100
24	0,1930	0,1100	1,75	1.930
25	0,1660	0,0900	1,84	1.660
26	0,098	0,0560	1,75	980