

U



UNIVERSIDAD DE CHILE

Facultad de Ciencias

Escuela de Pregrado



**IDENTIFICACIÓN GENÉTICA DE CULTIVARES DE MANZANO (*Malus x domestica*
BORKH.) POR MÉTODOS MOLECULARES**

Seminario para optar al título de Ingeniero en Biotecnología Molecular.

Gonzalo Humberto Ravest Catalán

Director de Seminario de Título: Dr. Patricio Hinrichsen

Profesor Patrocinante: Dra. Liliana Cardemil

SANTIAGO-CHILE

2008

UCH-FC
Biotecnología
R255
C-1

ESCUELA DE PREGRADO - FACULTAD DE CIENCIAS - UNIVERSIDAD DE CHILE



**“IDENTIFICACIÓN GENÉTICA DE CULTIVARES DE MANZANO
(*Malus x domestica* BORKH) POR MÉTODOS MOLECULARES”**

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular.

GONZALO HUMBERTO RAVEST CATALAN

Dr. Patricio Hinrichsen Ramírez
Director Seminario de Título

Handwritten signature of Patricio Hinrichsen Ramírez in blue ink, positioned above a horizontal line.

Comisión de Evaluación Seminario de Título

Dr. Michael Handford
Presidente Comisión

Handwritten signature of Michael Handford in blue ink, positioned above a horizontal line.

Dra. Claudia Stange
Correctora

Handwritten signature of Claudia Stange in blue ink, positioned above a horizontal line.



Santiago de Chile, Junio 2008



Agradecimientos

Una vez ya finalizado este trabajo y los estudios en la carrera de biotecnología molecular en la facultad de ciencias de la Universidad de Chile, quiero agradecer a todas las personas que de alguna u otra manera me ayudaron a completar esta etapa.

Primero, quiero agradecer al Dr. Patricio Hinrichsen por darme la oportunidad de hacer el seminario de título y una unidad de investigación en su laboratorio, y por su apoyo y confianza durante el transcurso de este trabajo. También quisiera agradecer a María Herminia Castro por toda su guía, por su paciencia al enseñarme y su constante buena disposición para ayudarme en el desarrollo de esta tesis. A Nilo Mejía por ayudarme a simplificar el método de trabajo usado para el desarrollo de los S-SAP, al igual que el gran aporte de su Taq "mágica".

Agradecer al Dr. Marco Méndez de INTA, por su ayuda en la construcción de los árboles filogenéticos, y por la amabilidad con que se mostro siempre para responder mis dudas y ayudarme en lo que fuera posible.

Quiero agradecer a todos los compañeros y amigos del laboratorio. Braulio, Carola, Eli, Jessica, Lisset, Pablo, Rodrigo y Ximena por la camaradería y amistad que se ha formado como grupo en el laboratorio. El desarrollo de la tesis no hubiera sido lo mismo sin este grupo que logra que el trabajo se haga más distendido, corto y entretenido.

Muchas gracias a mis compañeros y amigos de carrera Cristóbal, Freddy, Luis, Marcos y Jaime, un infiltrado de biología ambiental, por los buenos momentos, tallas y por todos estos años que hemos compartido en la facultad. Hubo de todo, momentos difíciles (99,9% relacionados con algún ramo, de preferencia alguna tercera prueba con calculadora en mano, jajaja) y momentos muy buenos que hicieron que siempre recuerde el paso por la carrera.

Finalmente, gracias de corazón a mis padres, Gonzalo y Virginia, por su apoyo incondicional que siempre me han dado. A mi papá que siga firme como siempre, trabajando a full y teniendo cada vez más ganas de aprender en las diferentes áreas que trabaja, lo que se transforma siempre en una inspiración enseñándome que no importa que tan difícil sea la tarea hay que siempre buscar resolverla. A mi mamá, simplemente por como es, siempre dispuesta a ayudar en lo que sea, a no dejarse rendir por nada y mostrar cariño en todo momento. A mis hermanos, Cata y Pablo, gracias por todo, ya que estos años que vivimos los tres juntos acá en Santiago nunca hubo problemas y siempre no importa lo que fuera buscamos la forma de ver en que ayudarnos. A los dos les deseo la mayor de las suertes en todo lo que hagan.

Ahora simplemente ver que depara el futuro, poner siempre el mejor ánimo y no dejarse rendir por nada, aunque se vea por momentos como algo muy difícil. Lo que si siempre va a ser seguro va a ser mi agradecimiento a toda la gente que me ha ayudado.





TABLA DE CONTENIDOS

RESUMEN	i
ABSTRACT.....	ii
I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Aspectos generales	1
1.2 Cultivares de manzanos y variaciones somaclonales.....	2
1.3 Marcadores moleculares	4
1.4 Uso de transposones como marcadores moleculares	5
1.5 Uso de retro-transposones para la identificación de clones.....	7
1.6 Hipótesis	8
1.7 Objetivos generales	8
1.8 Objetivos específicos.....	8
II. MATERIALES Y MÉTODOS.....	9
2.1 Material vegetal	9
2.2 Extracción de ADN	12
2.3 Microsatélites (SSR).....	13
2.4 Amplificación de polimorfismos de secuencia específica (S-SAP)	15
2.4.1 Digestión de ADN genómico	15
2.4.2 Ligación de adaptadores	15
2.4.3 Pre-amplificación (S-SAP + 1).....	16
2.4.4 Reacción de amplificación (S-SAP + 3)	16
2.5 Electroforesis en gel de poliacrilamida	17
2.6 Análisis estadístico	20
III. RESULTADOS.....	23
3.1 Análisis de microsatélites (SSR)	23
3.1.1 Análisis de genuinidad varietal.....	23



3.1.2 Detección de polimorfismos mediante SSRs.....	25
3.1.3 Reacción de amplificación (S-SAP + 3).....	31
3.1.4 Determinación de la capacidad discriminadora de los SSRs utilizados	33
3.1.5 Análisis de similitud genética basados en SSR.....	36
3.2 Análisis de amplificación de polimorfismos de secuencia específica (S-SAP).....	42
3.2.1 Amplificación de fragmentos en S-SAP +3.....	42
3.2.2 Detección de polimorfismos por S-SAP.....	43
IV. DISCUSIÓN.....	49
4.1 Confirmación de la identidad genética de los cultivares.....	49
4.2 Determinación de polimorfismos entre los cultivares.....	49
4.2.1 Análisis de microsatélites (SSR).....	49
4.2.2 Análisis estadísticos de diversidad genética.....	52
4.2.3 Determinación del número óptimo de marcadores de SSR para una colección de manzanos.....	53
4.2.4 Análisis de relaciones genéticas.....	56
4.2.5 Análisis de diversidad intra-varietal mediante S-SAP.....	58
V. CONCLUSIONES.....	61
VI. PROYECCIONES.....	62
VII. BIBLIOGRAFÍA.....	63

INDÍCE DE FIGURAS

Figura 1. Análisis de identidad varietal de las muestras recolectadas con partidor CH05e04.....	25
Figura 2. Separación electroforética de los alelos del marcador CH02b07.....	26
Figura 3. Separación electroforética de los alelos del marcador CH03d07.....	31
Figura 4. Ejemplo de un marcador de SSR multilocus (CH02c11).....	33
Figura 5. Árbol de parsimonia de los 29 cultivares analizados.....	38
Figura 6. Árbol de vecino más cercano de los 29 cultivares analizados.....	39
Figura 7. <i>Bootstrapping</i> de parsimonia y <i>Bootstrapping</i> de vecino más cercano.....	41
Figura 8. Gel de agarosa al 2% de una reacción de PCR de S-SAP+3 de la combinación de partidores LTR1 + C15.....	43
Figura 9. Patrones de amplificación de S-SAP para la combinación de partidores LTR1 +C13.....	44
Figura 10. Patrones de amplificación de S-SAP para la combinación de partidores LTR1 + C15.....	45
Figura 11. Geles de poliacrilamida al 6% de una reacción de S-SAP para la combinación de partidores LTR1 + C4.....	47
Figura 12. Separación electroforética del marcador de SSR CH02c11.....	55
Figura 13. Separación electroforética del marcador de SSR CH03g07.....	55
Figura 14. Separación electroforética del marcador de SSR CH03d02.....	55

INDÍCE DE TABLAS

Tabla 1. Lista de los cultivares utilizados para el análisis de identificación varietal.....	10-11
Tabla 2. Lista de SSRs utilizados para la identificación de los 56 cultivares de manzanos.....	14
Tabla 3. Lista de partidores utilizados en la reacción de PCR S-SAP + 3.....	18
Tabla 4. Lista de cultivares que presentaron problemas en una de las muestras obtenidas por triplicado.....	24
Tabla 5. Patrón alélico de los 56 cultivares estudiados.....	27-30
Tabla 6. Estadígrafos para los 17 marcadores de SSR estudiados.....	32
Tabla 7. Capacidad de diferenciación de cultivares de manzano de los 11 marcadores SSR más informativos.....	35
Tabla 8. Capacidad de diferenciación de los marcadores SSRs de cultivares de manzanos.....	35
Tabla 9. Número de fragmentos amplificados por S-SAP para las distintas combinaciones de partidores utilizadas en cada variedad.....	48

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
Ae	Número efectivo de alelos
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
CI	Índice de consistencia
°C	Grados centígrados
EcoRI	Enzima de restricción EcoRI
FR	Frecuencia de alelos nulos
GL	Grupo de ligamiento
He	Heterocigosidad esperada
Ho	Heterocigosidad observada
LTR	Repetición terminal larga
MseI	Enzima de restricción MseI
PAA	Poliacrilamida
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RI	Índice de retención
S-SAP	Polimorfismo de amplificación específica de secuencia
SSR	Repetición de secuencias simples o microsatélites

RESUMEN

Las manzanas son uno de los principales productos frutícolas en climas templados a nivel mundial, y Chile no es la excepción. Sólo en la temporada 2005/2006 se exportaron 716.000 toneladas, ubicándose en el segundo lugar en exportaciones frutícolas detrás de la uva de mesa [Asoex N°34. 2007].

Esto ha aumentando el interés por un sistema de identificación varietal que permita la protección de los derechos de propiedad intelectual y la correcta comercialización de los distintos cultivares. Al igual que en otras especies, esta identificación tradicionalmente se ha basado en la observación de características morfológicas y fenotípicas, método de difícil aplicación debido al gran número de cultivares existentes (miles por cada especie frutal) y además de la aparición de cultivares que son clones de una variedad original. Todo esto ha llevado a la búsqueda de nuevos métodos de identificación utilizando análisis directo del genoma de estas plantas mediante el uso de las herramientas disponibles en biología molecular.

Una de las herramientas más utilizadas son los marcadores moleculares que se destacan por su alto polimorfismo, su codominancia y su abundancia dentro del genoma, lo que los hace candidatos ideales para los estudios de identificación de cultivares.

En este estudio se utilizaron los marcadores moleculares de tipo microsatélite (SSR) y S-SAP. Con ellos se estudió una colección de 56 cultivares de manzanos, integrado por líneas de origen genético y clones derivados por mutaciones de estas mismas u otras variedades. Esta colección se estudió con 17 marcadores de tipo SSR, identificando una combinación de sólo 3 marcadores que permite diferenciar los cultivares de origen genético (no clonales). Para intentar diferenciar las variedades de origen clonal de los grupos 'Gala' y 'Fuji' se usaron 16 combinaciones de partidores de S-SAP, no lográndose obtener diferencias consistentes que ayudaran a la identificación de estos cultivares.

ABSTRACT

Apples are one of the major fruit produced in tempered climate countries and Chile is not exception of this. Only between the 2005/2006 season, Chile exported 716.000 tons of apples, placing this fruit only behind table grapes in Chile's exportations.

The main goal in the apple industry is the development of identification tools that protect exclusive rights of cultivars propagated around the world. Traditionally, the identification process in different species consists in observation of morphological and phenotypical traits. However, this method proved to be unsuccessful because of the large numbers of cultivars in the market and the slightly differences seen between closely related cultivars (e.g "clones"). In the past few years molecular tools as been used for identification purposes in plants.

Molecular markers are the most popular tools because of their valuable characteristics in the identification process like a high level of polymorphism, to be co-dominant in most cases and to be ubiquitous in the genome, Their unique characteristics makes them an ideal candidate for this kind of analysis.

The aim of this work is to use two kinds of molecular markers, microsatellites (SSR) and sequence amplified length polymorphism (S-SAP), in 56 apples cultivars. This collection have cultivars of clonal and non-clonal origin from diverse sources of varieties. In this collection 17 SSR markers were used in the analysis, identifying the non-clonal cultivars, and selecting a combination of three SSR markers capable to differentiate the whole collection. In the S-SAP analysis, 16 primers combinations were used with the goal of identify clonal cultivars of the groups 'Gala' and 'Fuji', but the differences observed were not consistent or reproducible, not helping to identify those cultivars groups.

I. INTRODUCCIÓN

1.1 Aspectos generales

En las últimas décadas, Chile se ha posicionado como un importante productor de frutas a nivel mundial destacándose principalmente la uva de mesa, manzanas rojas y verdes, peras, kiwis y carozos. Las exportaciones para la temporada 2005/2006 alcanzaron una producción de 2,19 millones de toneladas equivalentes a 230,8 millones de cajas, por un valor aproximado de US\$ 2.300 millones [Asoex N°34. 2007].

Las manzanas corresponden al segundo frutal en importancia para las exportaciones chilenas, con 592.412 toneladas (34.328.531 cajas) de manzanas rojas y 124.433 toneladas (7.081.250 cajas) de manzanas verdes. Aquí destacan principalmente los cultivares de manzanas rojas de los grupos 'Gala' (mayoritariamente 'Royal Gala'), Red Delicious ('Richared Delicious'), Fuji y Cripps Pink [Asoex N°34. 2007].

Todos estos antecedentes revelan la importancia de las manzanas para el mercado frutícola nacional, sin embargo existe un problema clave que tiene que ver con la correcta identificación de los distintos cultivares o variedades para su respectiva comercialización y la protección de los derechos de propiedad intelectual que ostentan sus obtentores y los viveristas que adquieren los derechos de uso sobre dichas variedades protegidas (patentadas o registradas, de acuerdo a la normativa de cada país). Cabe señalar que ambos términos ("cultivar" y "variedad") corresponden a un material genético singular obtenido por cruzamientos sexuales o por selección de germoplasma silvestre domesticado. Para fines prácticos, en esta tesis se usarán ambos términos como sinónimos, aunque en general, en fruticultura se usa más frecuentemente "cultivar", mientras que en plantas anuales o de propagación sexual se suele usar "variedad". En rigor, una "variedad" tiene una connotación taxonómica botánica, considerándosele en ocasiones como sinónimo de sub-especie. Tradicionalmente, la identificación de los distintos cultivares se realizaba mediante la

observación de características fenotípicas y morfológicas. Sin embargo, se ha hecho común la aparición de nuevos cultivares con mínimas diferencias de fenotipo respecto de una "variedad madre". Estos nuevos materiales, llamados genéricamente "clones", corresponden usualmente a mutaciones somaclónales que modifican caracteres como color o forma de frutos. La sutileza de estas diferencias hace que la identificación de estos clones sea cada vez más compleja e incluso en algunos casos imposible. Esto ha llevado a la búsqueda de nuevas formas de diferenciar e identificar variedades, por lo que se ha masificado a nivel mundial la identificación varietal mediante el análisis directo del genoma de las plantas recurriendo a herramientas de biología molecular.

1.2 Cultivares de manzanos y variaciones somaclónales

El manzano (*Malus x domestica* Borkh.) es, tanto por superficie plantada como por las transacciones implicadas en su comercialización, uno de los cultivos frutales más importantes del mundo en zonas templadas. Existe, una gran cantidad y diversidad de cultivares disponibles de esta especie de polinización abierta, que derivan de cruces generados por programas de mejoramiento y a la aparición espontánea de clones (ya sea por mutaciones al azar, influencia del ambiente o por efectos de otras variables como los elementos móviles del genoma). [GUARINO *et al.* 2005].

En la actualidad se conocen sobre 7.500 cultivares de manzanos divididos en dos grupos: manzanas para cocinar y manzanas para postre. Sin embargo, una gran cantidad de éstos corresponden a clones de una misma variedad, llegando a casos donde un porcentaje importante (hasta un 70%) de los cultivares ofrecidos por un vivero está compuesto de clones mutantes [SANSAVINI *et al.* 2004].

Se ha descrito en frutales, principalmente en vides, la existencia de heterogeneidad en las características morfológicas y en el comportamiento agronómico de clones pertenecientes a una misma variedad. MARTÍNEZ DE TODA (1991) estudió

este fenómeno y concluyó que estas diferencias se pueden organizar en tres grupos, según la causa que origina la diversidad observada: clones de origen policlonal, monoclonal o patogénico. En el origen policlonal los clones proceden de semillas distintas, pero presentan un nivel de similitud en sus características fenotípicas suficiente para clasificarlos como un mismo cultivar. Para clones de origen monoclonal, éstos provienen de una única semilla original y las diferencias que se pueden observar provienen de la acumulación de mutaciones somáticas. Finalmente, los clones de origen patogénico poseen diferencias producidas por la infección de un patógeno, como por ejemplo los virus.

En la actualidad, pese al gran número de cultivares de manzanos registrados son solo alrededor de diez variedades policlónales las que controlan el mercado a nivel mundial [SANSVINI *et al.* 2004]. Estos cultivares pertenecen esencialmente a los grupos 'Gala', 'Golden Delicious', 'Red Delicious', 'Jonagold', y 'Fuji'. Todos estos grupos poseen una amplia variedad de mutantes que cada vez han ido ganando más participación en el mercado, relegando casi al olvido a variedades tradicionales, cultivadas en grandes cantidades en el pasado (ej: 'Jonathan').

La aparición en las últimas décadas de este gran número de cultivares clonales ha ocasionado problemas relacionados con los derechos económicos sobre éstos, ya que muchos son propagados con derechos exclusivos, a pesar de que la gran mayoría son quimeras y presentan inestabilidad genotípica. Esta inestabilidad significa que, muchas veces un clon mutante revierte al estado fenotípico de la variedad original, como se ha visto con las mutaciones de 'Gala'.

Todos estos antecedentes hacen imprescindible buscar metodologías que permitan la identificación correcta de estos distintos cultivares y de sus respectivos clones, para lo cual se ha propuesto el uso de herramientas de análisis genético como los marcadores moleculares.

1.3 Marcadores moleculares

En el estudio de la identificación genética (*fingerprinting*) y *breeding* en manzanos, al igual que para el resto de los frutales, los marcadores moleculares han resultado ser una opción confiable y de relativo fácil uso. Entre las características deseables de un marcador molecular se encuentran: (1) Ser altamente polimórficos, (2) ser codominantes, es decir que permitan la determinación de estados homocigotos y heterocigotos de organismos diploides, (3) presentar una ocurrencia frecuente en el genoma, (4) No ser influenciados por condiciones ambientales o prácticas de manejo de campo, (5) ser de fácil disponibilidad, (6) ser altamente reproducibles, y (7) ser de fácil y rápido uso para el trabajo de laboratorio [JOSHI *et al.* 1999]. Debido a que es extremadamente difícil encontrar un marcador molecular que cumpla todas estas características, se debe elegir en base al tipo de estudio a realizar, cumpliendo siempre con el mayor número posible de estas características deseables.

Hasta el momento la mayoría de estos estudios en plantas han sido realizados con diferentes marcadores, como son los RFLPs (*Restricción Fragment Length Polymorphism*. NYBOM AND SCHALL. 1990), RAPDs (*Randomly Amplified Polymorphic DNA*. KOLLER *et al.* 1993), AFLPs (*Amplified Fragment Length Polymorphism*. GOULAO *et al.* 2001) y SSRs (*Simple Sequence Repeats*. LIEBHARD *et al.* 2002).

Los SSR son los más ampliamente utilizados debido a su alto grado de polimorfismo y a que exhiben una herencia de tipo codominante. Además sus resultados son de análisis sencillo y rápido. Los SSRs son unidades de 1 a 6 pares de base de largo que se repiten usualmente entre 10 y 30 o más veces, y esta unidad básica se repite en el genoma comúnmente cientos o miles de veces. SZEWC-MCFADDEN *et al.* (1995) fueron los primeros en identificar SSRs de manzanos en accesiones del *USDA-ARS Plant Genetic Resources Unit's core collection* de la universidad de Cornell. GIANFRASCHESCHI *et al.* (1998) describieron 16 marcadores de SSR con los que identificaron 19 cultivares de manzanos. Más recientemente, la lista de marcadores de este tipo se ha engrosado, LIEBHARD *et al.* (2002) realizó la caracterización de 140 nuevos SSRs de la especie, lo que ha facilitado no sólo la

identificación molecular sino el mapeo genético de la especie con este tipo de marcadores. En otros casos, se ha usado una combinación de SSRs y otros marcadores genéticos. Es así como KITAHARA *et al.* (2005), realizaron la caracterización molecular de 42 cultivares japoneses de manzano utilizando 19 marcadores de SSR y formas alélicas de genes de auto-incompatibilidad. A pesar de su amplio uso y eficiencia para identificar variedades de origen genético, los SSRs no son capaces de diferenciar efectivamente entre clones somáticos, inconveniente que es común para los otros marcadores mencionados más arriba.

1.4 Uso de transposones como marcadores moleculares.

Debido a la poca eficiencia en la detección de variedades clónales de distintas especies frutales por parte de los marcadores moleculares mencionados más arriba (con excepciones en variedades antiguas; ver por ejemplo a MONCADA, *et al.*, 2006), se han buscado nuevas formas de generar una identificación precisa de estos clones. Un serio candidato para la identificación de dichos clones es el uso de transposones como marcadores moleculares.

Los transposones, descubiertos por McCLINTOCK *et al.* (1948), inicialmente fueron catalogados como secuencias del genoma de las plantas que carecían de importancia, asemejándose más a un parasito que a un elemento clave para el desarrollo de éstas. Sin embargo, a medida que ha crecido el número de estudios sobre los transposones y su biología, su percepción ha cambiado hasta ser considerados como elementos cruciales en la evolución de los genomas de las plantas. Los transposones poseen dos características principales, una es la habilidad de poder moverse de un lugar a otro del genoma y la segunda es la habilidad de poder aumentar su número de copias mediante estas transposiciones [BENNETZEN *et al.* 2000]. Esto ha llevado a que sean vistos con interés para su uso como marcadores moleculares, gracias a que cada evento de transposición produce polimorfismos que pueden ser detectados usando técnicas moleculares. De esta manera, la ausencia o presencia de

éstos en un determinado locus puede ser usado para la caracterización varietal, *fingerprinting*, estudios de diversidad o filogenia [GRZEBELUS, 2005].

Los retro-transposones son la clase más distribuida y abundante de elementos transponibles eucarióticos. Estos se dividen en retro-transposones que poseen *Long terminal repeat* (LTR) y los que no poseen LTR. El primer grupo a su vez se divide en dos tipos de retro-transposones LTR, los Ty1-*copia* y los Ty3-*gypsy*, los cuales se diferencian en el orden en que están organizados sus genes. Estos retro-transposones están formados por un LTR en cada extremo, sitios de unión y empaquetamiento, y dominios proteicos donde hay tres poligenes: GAG, POL y ENV. Los retro-transposones LTR se replican en el genoma de la planta mediante un proceso que lleva a la síntesis de una molécula de ARNm y la posterior transformación de éste a una molécula de ADN lineal doble hebra, gracias a la actividad de transcripción reversa y RNAasa H que posee el mismo retro-transposón. Los retro-transposones que no poseen LTR son más simples que los que lo poseen, pese a compartir muchos genes con estos últimos. [KUMAR *et al*, 1999]

En manzanos la literatura sobre retro-transposones no es muy abundante. Sin embargo, YAO *et al*. (2003) encontraron una inserción de un retro-transposón LTR en un factor de transcripción MADS-box, que ocasiona la producción de flores sin pétalos que lleva al desarrollo de un fruto partenocárpico (sin semilla). Por otro lado, SUNAKO *et al*. (1999) identificaron un retro-transposón que no posee LTR en la región promotora del gen ACSI, donde las manzanas de árboles homocigotos producen menos etileno ocasionando un aumento en el tiempo de duración del fruto. Ambos retro-transposones han sido usados para estudios con marcadores moleculares.

1.5 Uso de retro-transposones para la identificación de clones.

Debido a su ubicuidad dentro del genoma de las plantas, los retro-transposones son un excelente candidato para su uso como marcador molecular, es por esto que en la última década han aparecido nuevas técnicas que detectan estas inserciones de estos elementos móviles. Aunque difieren en la metodología todas se basan en la utilización del PCR o hibridación [GRZEBELUS, 2005]. Entre las más utilizadas se encuentran IRAP (*Inter-Retrotransposon Polymorphism*), REMAP (*Retrotransposon-Microsatellite Polymorphism*), IMP (*Inter-MITE Polymorphism*), RBIP (*Retrotransposon-Based Insertion Polymorphism*) y S-SAP (*Sequence Specific Amplification Polymorphism*).

En estudios de mapeo, *fingerprinting* o estudios evolutivos se han utilizado IRAP, REMAP y S-SAP. Sin embargo, para esto es necesario conocer y caracterizar exhaustivamente el retro-transposón. En manzanos, VENTURI *et al.* (2005) realizó la caracterización y *fingerprinting* de clones de manzanos, basándose en el retro-transposón descrito por YAO *et al.* (2003). ANTONIUS-KLEMOLA *et al.* (2006), utilizó IRAP y REMAP basándose en un retro-transposón *in miniatura* para buscar diferencias entre variedades y clones, no obteniendo resultados positivos con estos últimos. De esta forma, hasta el momento sólo los marcadores moleculares del tipo S-SAP han sido capaces de discriminar entre clones de manzanos producidos de las variedades estándar que son comercializadas de forma habitual.

1.6 Hipótesis

Las variedades de manzano (*Malus x domestica* Borkh) originadas por cruzamiento sexual presentan niveles de heterocigosidad elevados, lo que se evidencia en el alto número de formas alélicas de secuencias hipervariables del tipo microsatélites. Por el contrario, en variedades originadas por mutaciones somaclónales el nivel de similitud genética es muy alto, y los polimorfismos más frecuentes que pueden servir como marcadores de diferenciación son elementos móviles del tipo retro-transposón.

1.7 Objetivos Generales

Evaluar la diversidad genética de manzano representado por una colección de cultivares de manzanos de origen sexual y clonal mediante el uso de marcadores moleculares.

1.8 Objetivos Específicos

- Establecer un panel de genotipos (cultivares de manzano) como material de ensayo y validación, incluyendo variedades de origen genético (hibridación) y derivadas por mutaciones somaclónales;
- Identificar las combinaciones de marcadores co-dominantes (SSR) más informativos, es decir que presente un mayor polimorfismo, para lograr la diferenciación del mayor número posible de variedades.
- Implementar el protocolo de S-SAP en base a tinción de plata para el análisis genético de variedades de manzano.
- Evaluar la capacidad de diferenciación de variedades originadas por mutaciones somaclónales (por ej. Familia de cultivares derivados de "Gala") usando el método dominante S-SAP.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Material Vegetal

Para el desarrollo de este estudio se utilizaron un total de 56 cultivares de manzanos. De ellos, 36 muestras fueron colectadas en el jardín de variedades de Univiveros y 20 fueron colectados en un jardín varietal de Viveros Requinoa. Dentro de este grupo dos cultivares se encuentran repetidos ('Galaxy' y 'Pink Lady'), ya que fueron colectados en ambos viveros.

En la colecta de las muestras se seleccionaron hojas jóvenes y pequeñas, propias de los brotes. Esta colecta se realizó en dos periodos, diciembre de 2006 (en Univiveros) y enero del 2007 (Viveros Requinoa). Todas las muestras de estos cultivares fueron obtenidas desde tres árboles distintos de la misma variedad.

De estos 56 cultivares, doce pertenecen al grupo "Gala", ocho al grupo "Fuji", tres al grupo "Verdes", tres al grupo "Rojas", cuatro al grupo "Jonagold" y tres al grupo "Pink Lady". Los restantes 24 cultivares no pertenecen a un grupo determinado respecto del resto los cultivares recolectados. El listado de las muestras se puede observar en la tabla 1.

Tabla 1: Lista de los cultivares utilizados para el análisis de identificación varietal. Nombre del cultivar, número de la muestra utilizado en el análisis, grupo en el que se pueden clasificar (para clones de una variedad original)

Muestra Nº	Cultivar	Número SAG correlativo	Grupo	Procedencia
1	Raku-Raku	162-164	Fuji	Univiveros
2	ANA 6	173-175	Verdes	Univiveros
3	Stamp	177-179	Rojas Delicious	Univiveros
4	Scarlet Spur	188-190	Rojas Delicious	Univiveros
5	ANA 8	194-196	Rojas Delicious	Univiveros
6	Excel	197-199	Jonagold	Univiveros
7	Bel-el	200-202	Elstar	Univiveros
8	Early Auvil Fuji	425-427	Fuji	Univiveros
9	Rosiglow	428-430	Pink Lady	Univiveros
10	Big Red Gala	431-432	Gala	Univiveros
11	Red Jonaprince	433-435	Jonagold	Univiveros
12	BF-14	437-439	Gala	Univiveros
13	Fuji Normal	440-442	Fuji	Univiveros
14	Blazer Fuji	443-445	Fuji	Univiveros
15	ANA 12	446-448	Venturia	Univiveros
16	Gale Gala	449-452	Gala	Univiveros
17	Jubilee	452-454	Fuji	Univiveros
18	Smith Gala	455-457	Gala	Univiveros
19	African Red	458-460	-	Univiveros
20	Pink Lady	461-463	Pink Lady	Univiveros
21	Manchurian	464-466	Manzano Flor	Univiveros
22	Grany Smith	467-469	Verdes	Univiveros
23	Braeburn	470-472	Braeburn	Univiveros
24	Tigress	473-475	Fuji	Univiveros
25	Sansa	476-478	-	Univiveros
26	Aztec	479-481	Fuji	Univiveros
27	Caudle	482-484	-	Univiveros
28	Pink Rose	485-487	-	Univiveros
29	Simons Gala	488-490	Gala	Univiveros
30	Jonagored Supra	491-492	Jonagold	Univiveros
31	Imperial Gala	493-495	Gala	Univiveros
32	Jonagored	496-497	Jonagold	Univiveros

Tabla 1. Continuación.

33	Sun Fuji	499-501	Fuji	Univiveros
34	Royal Gala	502-504	Gala	Univiveros
35	Galaxy	505-507	Gala	Univiveros
36	Pink Gala	508	Gala	Univiveros
37	Pink Lady	509-511	Pink Lady	Viveros Requinoa
38	Galaxy	512-514	Gala	Viveros Requinoa
39	Sunshu	515-516	-	Viveros Requinoa
40	Crimson Gala	517-519	Gala	Viveros Requinoa
41	Washington Spur	520-522	-	Viveros Requinoa
42	Cordel	523-525	-	Viveros Requinoa
43	Spur Gold Blush	526-528	-	Viveros Requinoa
44	Coromon del Red	529-531	-	Viveros Requinoa
45	X3318	532-534	-	Viveros Requinoa
46	X4982	535-537	-	Viveros Requinoa
47	X6938	538-540	-	Viveros Requinoa
48	Cybele	541-543	-	Viveros Requinoa
49	Royal Gala N° 4	544-546	Gala	Viveros Requinoa
50	Verline	547-549	-	Viveros Requinoa
51	Baujade	550-552	-	Viveros Requinoa
52	Everest	553-555	-	Viveros Requinoa
53	Sf 92092	556-558	-	Viveros Requinoa
54	Early Granny Smith	559-561	Verdes	Viveros Requinoa
55	Delkistar	562-564	-	Viveros Requinoa
56	Sundowner	565-567	-	Viveros Requinoa

2.2 Extracción de ADN

Las extracciones de ADN se realizaron mediante un protocolo [LODHI *et al.* 1994] adaptado en el laboratorio de biotecnología de INIA-La Platina. El protocolo consiste en moler una hoja pequeña de manzano en un tubo eppendorf de 1,5 mL con una bolita de acero mediante el uso del robot Mini-Beadbeater™ (Biospec Products), en el cual se agregó previamente 0,7 mL de tampón de extracción (EDTA 20mM; Tris-HCl 100 mM; NaCl 1,4 mM, CTAB 2% p/v; pH 8.0), β-mercaptoetanol al 0,2% y 10 mg de PVP. Posteriormente se incubó durante 30 min a 65°C. Terminada la incubación se agregó 0,6 mL de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1) y se mezcló suavemente por inversión, se centrifugó a 8000 rpm por 15 min y después se transfirió 0,45 mL de sobrenadante a un nuevo tubo eppendorf de 1,5 mL. A este nuevo tubo eppendorf se le agregó ½ volumen de NaCl 5M y dos volúmenes de etanol absoluto. Se mezcló y se incubó por 30 min o más a 4°C. Posteriormente se realizaron dos centrifugaciones, una a 3.000 rpm por 3 min y otra a 6.000 rpm por 3 min para precipitar el ADN en el fondo del tubo. Se descartó el sobrenadante y se lavó dos veces el pellet de ADN con 0.5 mL de etanol 76%. Entre cada lavado se realizó una centrifugación a 10.000 rpm por 5 min a 4°C. A continuación el pellet fue secado y resuspendido en 100 µL de H₂O destilada autoclavada, se agregó 1 µL de RNasa A una concentración de 10mg/µL y se incubó a 37°C por 30 min. El ADN fue guardado a 4°C hasta su posterior uso.

El ADN extraído fue cuantificado por absorbancia a 260/280 nm en un espectrofotómetro Shimadzu UV-160A UV-visible. Además, se verificó la calidad del ADN mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% en tampón TBE 1X. El tampón Tris-borato EDTA (TBE) se prepara en una solución stock 10X que contiene Tris base 0,9 M; ácido bórico 0,9 M y EDTA (Tritriplex III) 0,02 M.

2.3 Microsatélites (SSR)

Se utilizaron 20 marcadores de microsatélites (tabla 2), para el análisis de los cultivares de manzanos, seleccionados a partir de 140 marcadores desarrollados y caracterizados por LIEBHARD *et al.* (2002). Para su elección se consideraron marcadores de distintos grupos de ligamiento (14 de los 17 grupos de ligamiento) en base al trabajo antes mencionado. La mezcla de reacción de PCR utilizada para cada marcador contó con 5 μ L de ADN (5 ng/ μ L); 1,6 μ L de tampón de reacción 10X (Tris 100 mM; KCl 500 mM; pH 8.3), 0,5 μ L de MgCl₂ 50 mM; 1,6 μ L de dNTPs 10 mM; 1 μ L de solución mezcla de cada partidor de SSR 5 pmol/ μ L; 0,16 μ L de Taq ADN polimerasa, y 7,3 μ L de H₂O destilada completándose un volumen final de 17 μ L de reacción.

El programa de amplificación de la reacción de PCR consistió en una fase de desnaturalización inicial a 95°C por 7 min, seguida de 40 ciclos correspondientes a 40 seg a 94°C, 45 seg a 56°C (*annealing*), 90 seg a 72°C (elongación) y por último una fase de elongación final por 10 min a 72°C.

En la tabla 2 se muestran los marcadores de SSR utilizados indicando su secuencia, grupo de ligamiento (GL, grupo de marcadores moleculares o genes que se conocen están ligados a un cromosoma. En este caso, cada grupo de ligamiento equivale a un cromosoma), el tipo de repetición y tipo de marcador.

Tabla 2. Lista de SSRs utilizados para la identificación de los 56 cultivares de manzanos. Nombre de cada marcador, secuencia de partidores directo y reverso, grupo de ligamiento (GL) donde se ubica el SSR, tipo de repetición (perfecta = perf; compuesta = comp; imperfecta = imp) y tipo de marcador (single locus =sloc; presumiblemente multi locus = pres mlloc). Marcadores obtenidos de Liebhard et al. (2002).

Nombre	Secuencia partidor directo (5'-3')	Secuencia partidor reverso (5'-3')	GL	Tipo repetición	Tipo marcador
CH03d10	CTCCTTTACCAAAAACACCCAAA	GTGATTAAGAGAGTGATCGGGG	2	comp	sloc
CH02c02b	TGCATGCATGGAAACGAC	TGAAAAAGTCACACTGCTCC	4	perf	sloc
CH04e05	AGGCTAACAGAAATGGTTTG	ATGGCTCCATTGCCCATCAT	7	perf	pres mlloc
CH03g07	AATAAGCATTCAAAGCAATCCG	TTTTCCAAATCGAGTTTCGTT	3	perf	sloc
CH05e04	AAGGAGAAGACCGTGTGAAATC	CATGGATAAGGCATAGTCAGGA	16	perf	pres mlloc
CH01a09	GATGTGCCAGAAGCTAC	CACATGCATGAAAAGCATAT	-	comp	pres mlloc
CH01h01	GAAAGACTTGCAGTGGGAGC	GGAGTGGTTTTGAGAAGGTT	17	perf	sloc
CH01d08	CTCCGCCGTATAACACTTC	TACTCTGGAGGGTATGTCAAAG	15	perf	sloc
CH01h02	AGAGCTTCGAGCTTCGTTTG	ATCTTTTGGTGTCTCCACAC	9	imp	sloc
CH01f02	ACCACATTAGAGGAGTTGAGG	CTGGTTTTGTTTTCTCCAGC	12	perf	sloc
CH01f07a	CCCTACACAGTTTCTCAACCC	CGTTTTTGGGTAGGAAC	10	perf	sloc
CH03d02	AAACTTTCACTTCCACCCACG	ACTACATTTTAGATTG TCGGTC	11	imp	sloc
CH04e03	TTGAAGATGTTGGCTGTGC	TGCATGCTGTCTCCTCCAT	5	perf	sloc
CH02c11	TGAAGGCAATCACTCTGTGC	TTCCGAGAAATCCTCTTCGAC	10	imp	sloc
CH02b07	CCAGACAAAGTCATCACAACACTC	ATGTCGATGTCGCTCTGTTG	10	perf	sloc
CH02d08	TCCAAAATGGCGTACCTCTC	GCAGACACTCACTCACTATCTCTC	11	perf	sloc
CH03d07	CAAAATCAATGCAAAACACTGTCA	GGCTTCTGGCCCATGATTTTA	6	perf	sloc
CH04a12	CAGCCTGCAACTGCACCTTAT	ATCCATGGTCCCATAAACCA	11	imp	sloc
CH01c06	TTCCCCATCATCGATCTCTC	AAACTGAAGCCCATGAGGGC	8	perf	sloc
CH03h03	AAGAAATCGGATCCAAAACAAC	TCCCTCAAAGATTGCTCCTG	13	perf	pres mlloc

2.4 Amplificación de polimorfismos de secuencia específica (S-SAP)

Las reacciones de S-SAP fueron realizadas a partir del protocolo de WAUGH *et al* (1997).

2.4.1 Digestión de ADN genómico

En este protocolo el ADN total es digerido con dos enzimas de restricción, *MseI* (corte frecuente) y *EcoRI* (corte poco frecuente), al mismo tiempo, donde se utilizó una mezcla de 100 ng de ADN genómico; 1,0 µL de tampón *EcoRI*; 0,3 µL de *MseI* (10U/µL); 0,3 µL de *EcoRI* (20 U/µL) y se completó con H₂O destilada hasta alcanzar 10 µL de volumen final. La digestión se realizó por dos horas a 37°C, se agitó suavemente en vórtex y luego se continuó la digestión toda la noche a 37°C. Finalmente, se detuvo la digestión por denaturación a 70°C durante 15 min.

2.4.2 Ligación de adaptadores

Finalizada la digestión se procedió a ligar adaptadores específicos para los sitios de corte producidos por *MseI* y *EcoRI*, que sirven de ancla para las posteriores reacciones de amplificación que finalmente completan la reacción de S-SAP.

La mezcla de la reacción de ligación se agregó en el mismo tubo eppendorf de 0,6 mL en el cual se realizó la digestión y consiste en 1 µL de adaptador *MseI*; 1 µL de adaptador *EcoRI*; 0,5 µL de T4 DNA ligasa (1 U/µL); 2,0 µL de tampón 10X (Tris 100 mM; KCl 500 mM; pH 8.3) y 5,5 µL de H₂O destilada, hasta completar un volumen de 10 µL de reacción de ligación.

Los adaptadores utilizados fueron los siguientes:

MseI: 5' GACGATGAGTCCTGAG 3' *EcoRI*: 5' CTCGTAGACTGCGTACC 3'

5' TACTCAGGACTCAT 3' 5' AATTGGTACGCAGTCTAC 3'

2.4.3 Pre-amplificación (S-SAP +1)

Una vez completada la ligación se preparó una reacción de pre-amplificación, también llamada S-SAP +1 en referencia a que se agrega a los partidores utilizados en el PCR una base extra selectiva que disminuye el número de fragmentos a amplificar.

Se utiliza esta reacción ya que los retro-transposones, debido a su abundancia en el genoma, presentan un número muy elevado de copias generando en el PCR de S-SAP un número de fragmentos amplificados demasiado abundante y de difícil manejo. Con esta pre-amplificación se reduce el número de bandas para la reacción de PCR final de S-SAP y se enriquece la muestra con fragmentos de tamaños más pequeños (menor a 1 Kb) facilitando su visualización (Rico, 2005).

La reacción de pre-amplificación contiene 2,5 µL de producto de la solución de ligación; 2,5 µL de tampón 10X (Tris 100 mM; KCl 500 mM; pH 8.3); 0,75 µL de MgCl₂ 50 mM; 2,5 µL de dNTPs; 0,25 µL de Taq ADN polimerasa; 2,5 µL de partidor Eco; 2,5 µL de partidor Mse y 11,5 µL de H₂O destilada.

El programa de PCR de la reacción de pre-amplificación consistió en 2 min a 72°C, 20 ciclos consistentes en 20 seg a 94°C, 30 seg a 44°C y 2 min a 72°C. Finalmente, un ciclo de 30 min a 60°C. Posteriormente se preparó una dilución de trabajo 1:50 que se almacenó a -20°C.

Los partidores utilizados en la reacción de PCR S-SAP + 1 fueron:

Eco + 1: 5' GACTGCGTACCAATTC 3' Mse + 1: 5' GATGACTCCTGAGTAA 3'

2.4.4 Reacción de amplificación (S-SAP +3)

La reacción de amplificación es similar a la que se realizó en la etapa de pre-amplificación, con la diferencia que se utiliza un solo partidor que reconoce un sitio de restricción (*EcoRI* o *MseI*) y un partidor de un retro-transposón. Además, los partidores de enzima de restricción utilizados contienen tres bases selectivas para disminuir el número de fragmentos de la reacción final.

Para el análisis de S-SAP, se realizaron 16 amplificaciones en total utilizando un partidador basado en enzimas de restricción (*MseI*) y un partidador de retro-transposón (llamado LTR). Se utilizó un partidador de retro-transposón (LTR1 5' GCAATTCGTTTCATTACAG 3') el cuál fue diseñado por VENTURI *et al.* (2005), a partir de la única secuencia disponible de retro-transposón de manzanos (secuencia GenBank AJ291492, YAO *et al.* 2001).

La reacción de amplificación contiene 1,0 µL de producto de pre-amplificación diluido (1:50); 1 µL de tampón 10X (Tris 100 mM; KCl 500 mM; pH 8.3); 0,3 µL de MgCl₂ 50 mM; 1 µL de dNTPs; 0,1 µL de Taq ADN polimerasa; 1 µL de primer *Mse* +3; 0,5 µL de primer LTR y H₂O destilada para completar una volumen final de 10 µL. El programa de amplificación consistió en 20 seg a 94°C, 10 ciclos de 30 seg a 54°C, 2 min a 72 °C disminuyendo en -1°C por ciclo. Luego continuó una etapa de 20 ciclos con 20 seg a 94°C, 30 seg a 44°C y 2 min a 72°C. Finalmente, la amplificación concluye con 30 min a 60°C. Las muestras se almacenaron a -20°C o a 4°C si se realizaba inmediatamente su visualización.

La tabla 3 indica las secuencias de los partidadores utilizados en las reacciones de PCR S-SAP + 3.

2.5 Electroforesis en gel de poliacrilamida (PAA)

Los productos de PCR tanto para SSR como para S-SAP fueron analizados mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (PAA) desnaturante al 6%. Este gel consiste en dos vidrios templados, uno sin pestaña que va a servir de base para el gel y que es donde finalmente el gel queda adherido, y otro con pestaña que sirve para formar la estructura que va a contener el gel durante el tiempo que dure la electroforesis. Esto implica una preparación diferencial de ambos vidrios antes de agregar el gel, ya que de esto depende que sólo un vidrio quede con el gel adherido.

El vidrio con pestaña es lavado con etanol dos veces, se deja secar y luego se le agrega 350 µL de Repel Silane® (evita que el gel se pegue a este vidrio) el cual es

Tabla 3. Lista de partidores utilizados en la reacción de PCR S-SAP + 3

Nombre	Secuencia Partidor
LTR1	5' GCAATTCGTTTCATTACAG 3'
Msel + C1	5'- GAC TGC GTA CCA ATT C CAA -3'
Msel + C2	5'- GAC TGC GTA CCA ATT C CAC -3'
Msel + C3	5'- GAC TGC GTA CCA ATT C CAT -3'
Msel + C4	5'- GAC TGC GTA CCA ATT C CAG -3'
Msel + C5	5'- GAC TGC GTA CCA ATT C CCA -3'
Msel + C6	5'- GAC TGC GTA CCA ATT C CCC -3'
Msel + C7	5'- GAC TGC GTA CCA ATT C CCT -3'
Msel + C8	5'- GAC TGC GTA CCA ATT C CCG -3'
Msel + C9	5'- GAC TGC GTA CCA ATT C CTA -3'
Msel + C10	5'- GAC TGC GTA CCA ATT C CTC -3'
Msel + C11	5'- GAC TGC GTA CCA ATT C CTT -3'
Msel + C12	5'- GAC TGC GTA CCA ATT C CTG -3'
Msel + C13	5'- GAC TGC GTA CCA ATT C CGA -3'
Msel + C14	5'- GAC TGC GTA CCA ATT C CGC -3'
Msel + C15	5'- GAC TGC GTA CCA ATT C CGT -3'
Msel + C16	5'- GAC TGC GTA CCA ATT C CGG -3'

esparcido cuidadosamente con un trozo de papel absorbente por todo el vidrio. Para el caso del vidrio sin pestaña, éste es lavado con etanol dos veces, se deja secar y luego se le agrega una solución de Bind Silane® (1 mL etanol al 95%, 5 µL del adherente y 5 µL de ácido acético al 10%). El exceso de Bind Silane® es removido con etanol técnico y papel absorbente. Cuando ambos vidrios ya se encuentran secos después de estos tratamientos se procede a armar el sistema que va a contener al gel, para lo cual se colocó dos separadores que van a generar un pequeño espacio entre ambos vidrios y que va a contener al gel de PAA.

La mezcla de PAA consiste en 75 mL de acrilamida-urea al 6% (bis-acrilamida al 40%, urea 7,5 M y tampón TBE 0,5X), 80 µL de persulfato de amonio al 20% en H₂O y 80 µL de N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina (TEMED).

A los productos de PCR tanto de SSR como S-SAP antes de ser cargados en el gel se les agregó entre 8 µL y 12 µL de tampón de carga desnaturante (28,5 mL de formamida; EDTA 0,5 M y 30 mg de xilencianol.). A continuación, se denaturaron las muestras por 10 min a 95°C y se dejaron en hielo por el tiempo que dure la carga del gel. 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. Antes de cargar las muestras en el gel, este se sometió a una pre-corrida de una hora (o hasta que se alcancen los 50°C en el gel) a 1900 V, 55 mA y 90 W. La corrida electroforética se realizó en las mismas condiciones y tuvo una duración de dos horas para SSR y de tres horas para S-SAP. Finalizada la corrida se procedió a separar los vidrios y realizar la tinción con nitrato de plata. Esta tinción consistió en sumergir el gel durante 30 min en 2 L de solución de ácido acético al 10%(solución de fijación), luego realizar dos lavados de 5 min cada uno con 2 L de H₂O destilada, para luego sumergir 30 min en solución de 5 g de AgNO₃ en 2 L de H₂O destilada y 3 mL de formaldehido (solución de teñido), y una etapa final donde se reveló en 1 L de solución con 36 g de Na₂CO₃; 1,75 mL de formaldehido 37% y una granalla de tiosulfato de sodio anhidro. El revelado se mantuvo hasta que los amplicones contrastaron lo suficiente en relación a la tinción de fondo del gel, tratando siempre de evitar que la tinción de fondo no permita observar correctamente estos resultados. El gel al retirarse de la solución de

fijación se mantuvo unos momentos en la solución de ácido acético al 10% para de esta forma detener el exceso de tinción.

2.6 Análisis estadístico

Para el análisis con SSR se determinó para cada marcador el número de alelos, frecuencia de estos, genotipos identificados, y el tamaño estimado en pares de bases.

Con esta información se determinó una serie de parámetros de interés en el estudio de los SSR que sirvieron para conocer la efectividad individual de cada marcador y de estos como conjunto. Así mismo, de esta forma se pudo establecer cuáles son las mejores combinaciones para una determinación sencilla y fácil de la identidad genética de distintos cultivares.

Para los análisis de nivel de heterocigosidad se realizaron los cálculos de (1) número efectivo de alelos (A_e):

$$A_e = 1/\sum p_i^2 \quad ; \text{ donde "pi" es la frecuencia del alelo.}$$

(2) Heterocigosidad observada:

$$H_o = N^{\circ} \text{ individuos heterocigotos} / N^{\circ} \text{ de individuos analizados}$$

(3) Heterocigosidad esperada:

$$H_e = 1 - \sum p_i^2$$

(4) Frecuencia de alelos nulos (FR ó r):

$$FR(r) = H_e - H / 1 + H_e$$

Para comparar la capacidad de diferenciación de cada marcador de SSR, ya sea de manera individual o como una combinación de varios de ellos, se utilizó una fórmula deducida por TESSIER *et al.* (1999), donde se calcula el número teórico de pares genéticos no diferenciables (X_k) aumentando gradualmente el número de combinaciones de marcadores hasta llegar a un número donde todos los cultivares

estudiados son diferenciables. El número teórico de pares genéticos no diferenciables se determinó con la siguiente fórmula:

$$X_k = \frac{N(N-1)}{2} \prod_{j=1}^k C_j, \quad \text{donde } N \text{ es el número de genotipos}$$

estudiados y $[N(N-1)/2]$ es el número de pares de combinaciones diferentes entre genotipos, C_j es la probabilidad de confusión de un primer, que equivale a la probabilidad de que dos individuos seleccionados al azar presenten identidad en su *fingerprinting*.

Para los análisis filogenéticos se trabajó con dos métodos de reconstrucción filogenética, un árbol construido con el método de parsimonia y otro construido con el método de vecino más cercano, utilizando el programa PAUP [SWOFFORD. 1993]. Se realizó también, *bootstrapping* con 100 pseudoreplicas para cada uno de los árboles construidos con estos métodos.

En ambos métodos los resultados de los alelos obtenidos para cada partidor de SSR fueron ingresados como números binarios indicando con 1 presencia del alelo o con un 0 la ausencia de este. Cada alelo es considerado como un carácter, o sea es una característica observable de un organismo, usado para distinguir uno de otro.

El método de parsimonia se basa en la suposición de que el árbol más probable es aquel que requiere el menor número de cambios, o sea que requiera menor número de pasos para la construcción del árbol para explicar los datos con que se trabaja [HALL. 2001]. En parsimonia no todos los caracteres son utilizados en la construcción de los árboles, aquí los caracteres invariantes, que se repiten en todas las muestras, y los caracteres únicos, que ocurren en sólo una muestra, no son útiles para el análisis.

Se obtuvo además, una serie de índices que nos indican características del árbol y su construcción, entre estos están: (1) el índice de consistencia (CI), que es una medida de cómo el set de datos con que se trabaja se ajustan a la topología particular del árbol. Aquí la homoplasia [KITCHING *et al.* 1998] juega un rol muy importante, ya que en árboles con poca o sin homoplasia los valores de CI son cercanos a 1, mientras

que aquellos que muestran una homoplasia considerable el CI tiende a ser bajo; (2) el índice de homoplasia (HI), que indica el porcentaje de caracteres similares pero que evolucionaron de forma independiente; (3) el índice de retención (RI), que mide la fracción de sinapomorfia aparente (carácter homólogo originado a partir de un ancestro común compartido por dos o más taxas) con respecto a la sinapomorfia real; y finalmente (4) el índice de consistencia re-escalado (RC) que sirve para ver cuál es bajo las posibles peores circunstancias, el número de pasos mínimo necesarios para explicar la evolución de caracteres del árbol construido [WILEY *et al.* 1991].

El método de vecino más cercano (*Neighbor Joining*) es un método de distancia, los que consisten en expresar las diferencias observadas como distancias, o sea que tan cerca o tan lejos. Este método se basa en la utilización de un algoritmo para la construcción del árbol a partir de los datos. Aquí a diferencia de lo observado en parsimonia sólo se obtiene un árbol [HALL. 2001]. Existen dos métodos de distancia usados habitualmente, (1) UPGMA, que calcula las distancias mediante un método de agrupamiento, y el de vecino más cercano, aunque es este último a casi remplazado totalmente a UPGMA en la literatura.

Para cada uno de los tipos de árboles obtenidos se realizó *bootstrap*, que 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 pseudoreplicas, un conjunto de datos creado artificialmente por re-muestreo, del conjunto de datos reales [KITCHING *et al.* 1998]

III. RESULTADOS

3.1 Análisis de Microsatélites (SSR)

3.1.1 Análisis de genuinidad varietal

Antes de iniciar los análisis de identificación varietal de los 56 cultivares de manzanos recolectados, se procedió a verificar que las muestras obtenidas (3 árboles distintos) para cada cultivar efectivamente fueran idénticas, garantizando de esta forma que el material genético proporcionado por los viveros correspondiese a las muestras por ellos descritas.

Para esto, se estudiaron los patrones alélicos de tres marcadores de microsatélite (SSR), CH03d10, CH03g07 y CH05e04, sobre todas las muestras obtenidas (162 muestras correspondientes a 56 cultivares). Estos marcadores fueron elegidos del grupo de marcadores usados por VENTURI *et al.* (2005), debido a que ellos describieron el tamaño estimado en pares de bases de los alelos de cada uno de estos marcadores facilitando la observación de las muestras. Este análisis informó que en 14 de los 56 cultivares existía heterogeneidad genética, manifestada como una muestra distinta a las otras dos. De hecho, al verificar que algunas de estas muestras correspondían a un grupo de cultivares clonales (por ejemplo, grupo 'Fuji'), los cuales comparten un patrón genético común (ver más adelante), se comprobó que hasta dos de las tres muestras de la variedad evaluada no correspondían al grupo clonal. En estos casos se procedió a hacer una segunda colecta de estas muestras, para chequear si realmente existía un error con las primeras muestras obtenidas. El resumen de lo encontrado se presenta en la tabla 4.

Tabla 4. Lista de cultivares que presentaron problemas en una de las muestras obtenidas por triplicado

Cultivar	Nº muestras erróneas/Nº muestras totales	Grupo	Remuestreo
ANA 6	1/3	Verdes	Si
Stamp	1/3	Rojas	Si
Scarlet Spur	1/3	Rojas	Si
Granny Smith	1/3	Verdes	Si
Braeburn	1/3	Braeburn	Si
'Tigress'	2/3	Fuji	Si
'Pink Rose'	1/3	-	Si
'Sun Fuji'	1/3	Fuji	Si
'Royal Gala'	1/3	Gala	Si
'Crimson Gala'	1/3	Gala	No*
'Spur Gold Blush'	1/3	-	No*
'Coromon del Red'	1/3	-	No*
'Verline'	1/3	-	No*
'Delkistar'	1/3	-	No*

*Muestras que no fueron remuestreadas, debido a que sólo se realizó una segunda visita a Univiveros, y no a Viveros Requinoa.

Un ejemplo de este análisis de las muestras en triplicado se puede observar en la figura 1.

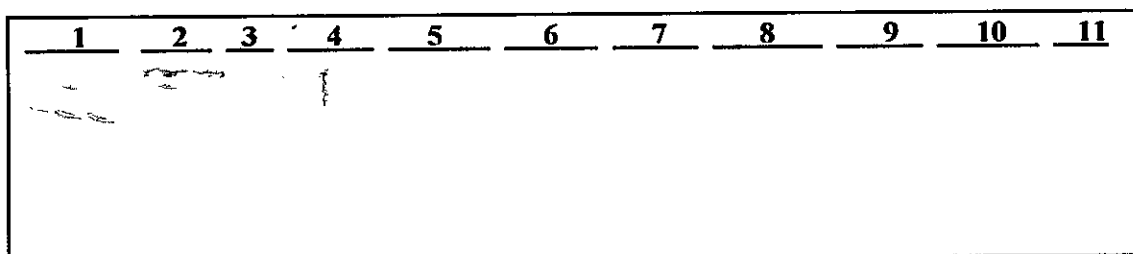


Figura 1. Análisis de identidad varietal de las muestras recolectadas con partidor CH05e04. 1: 'Pink Lady', 2: 'Galaxy', 3: 'Sunshu', 4: 'Crimson Gala', 5: 'Washington Spur', 6: 'Cordel', 7: 'Spur Gold Blush', 8: 'Coromon del Red', 9: 'x3318', 10: 'x4982', 11: 'x6938'.

Realizados los análisis con los tres marcadores SSR, se eligió una muestra representativa de cada cultivar para luego ensayar el resto de los marcadores con un número más conveniente de muestras.

3.1.2 Detección de polimorfismos mediante SSRs.

Para analizar las diferencias entre los 56 cultivares, se procedió a observar el patrón alélico de éstos mediante el análisis de 20 marcadores SSR (ver tabla 2). De este número total, los marcadores CH02c02, CH01h01 y CH01d08, fueron eliminados del análisis debido a dificultades en la visualización de los diferentes patrones alélicos, haciendo imposible su estudio sistemático en la colección de genotipos elegidos. En el caso de los otros 17 marcadores se registró el patrón alélico de cada muestra y se determinó el tamaño en pares de bases correspondiente a cada uno (tabla 5).

En el caso de los cultivares que poseen un origen común ("grupo clonal"), todos presentaron un mismo patrón alélico con todos los marcadores ensayados. Es decir, los clones de los distintos grupos, "Fuji" (ocho cultivares), "Gala" (doce cultivares), "Verdes" (tres cultivares), "Rojas" (tres cultivares), "Jonagold" (cuatro cultivares) y

"Pink Lady" (tres cultivares) no presentaron diferencias entre clones. Por el contrario, el resto de las muestras de variedades derivadas de cruzamientos se diferenciaron con relativa facilidad, con numerosos marcadores.

La Figura 2 Muestra los productos de PCR de 45 muestras con el marcador CH02b07. Los primeros ocho carriles muestran a los ocho cultivares clonales de 'Fuji', los once carriles siguientes muestran los cultivares clonales de 'Gala', el resto de los carriles son distintos cultivares de la colección de estudio.

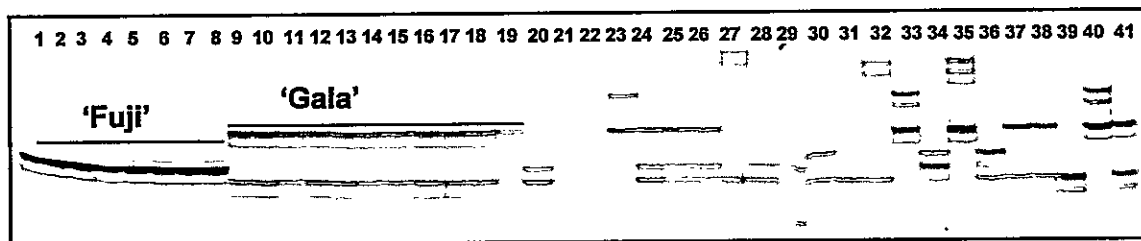


Figura 2. Separación electroforética de los alelos del marcador CH02b07. Con una línea se indican los cultivares correspondientes a clones de los grupos 'Fuji', y 'Gala'. El resto de las muestras son distintas variedades de la colección.

Orden de las muestras: 1) Raku-Raku, 2) E. Auvil Fuji, 3) Blazer Fuji, 4) Fuji Normal, 5) Jubilee, 6) Tigress, 7) Aztec, 8) Sun Fuji, 9) Big Red Gala, 10) BF-14, 11) Gale Gala(1), 12) Gale Gala (2), 13) Smith Gala, 14) Simons Gala, 15) Imperial Gala, 16) Royal Gala, 17) Galaxy (UV), 18) Galaxy (VR), 19) Royal Gala N°4, 20) Scarlet Spur, 21) N.A, 22) Excel, 23) Rosiglow, 24) Red Jonaprince, 25) Jonagored Supra, 26) Jonagored, 27) Ana 12, 28) African Red, 29) Manchurian, 30) Granny Smith, 31) Braeburn (1), 32) Sansa, 33) Pink Rose, 34) E. Granny Smith(1), 35) Cybele, 36) E. Granny Smith (2), 37) Crimson Gala, 38) Pink Gala, 39) Braeburn (2), 40) Pink Lady, 41) Cordel. Muestra 21 no amplificó. UV = Univiveros, VR = Vivero Requinoa.

En esta electroforesis se observa claramente como los grupos de cultivares clonales tanto de 'Fuji' como de 'Gala' presentaron patrones equivalentes entre sí aunque diferentes entre ambos grupos, haciendo de esta manera imposible la diferenciación individual de cada uno de estos cultivares clonales. Sin embargo, para los otros grupos de cultivares el patrón alélico sí presentó diferencias, permitiendo identificar cada uno de estos cultivares considerando la información acumulada de varios marcadores (ver más abajo).

Tabla 5. Patrón alélico de los 56 cultivares estudiados. Cada valor indica tamaño en pares de base (pb). ND = no determinado. Los individuos homocigotos para determinado marcador están representados con un solo alelo anotado dos veces.

Grupo	Muestras	Marcador								
		CH03d10	CH04e05	CH03g07	CH05e04	CH01a09	CH01h02	CH01f02	CH01f07a	CH03d02
Fuji	Raku-Raku	195-184	214-188	136-128	177-172	222-218	257-257	203-199	224-203	257-236
Fuji	E. Auvil Fuji	195-184	214-188	136-128	177-172	222-218	257-257	203-199	224-203	257-236
Fuji	Fuji Normal	195-184	214-188	136-128	177-172	222-218	257-257	203-199	224-203	257-236
Fuji	Blazer Fuji	195-184	214-188	136-128	177-172	222-218	257-257	203-199	224-203	257-236
Fuji	Jubilee	195-184	214-188	136-128	177-172	222-218	257-257	203-199	224-203	257-236
Fuji	Tigress	195-184	214-188	136-128	177-172	222-218	257-257	203-199	224-203	257-236
Fuji	Aztec	195-184	214-188	136-128	177-172	222-218	257-257	203-199	224-203	257-236
Fuji	Sun Fuji	195-184	214-188	136-128	177-172	222-218	257-257	203-199	224-203	257-236
Gala	B. Red Gala	194-178	188-188	140-128	177-177	218-212	257-247	224-188	203-200	286-260
Gala	BF-14	194-178	188-188	140-128	177-177	218-212	257-247	224-188	203-200	286-260
Gala	Gale Gala	194-178	188-188	140-128	177-177	218-212	257-247	224-188	203-200	286-260
Gala	Smith Gala	194-178	188-188	140-128	177-177	218-212	257-247	224-188	203-200	286-260
Gala	Simons Gala	194-178	188-188	140-128	177-177	218-212	257-247	224-188	203-200	286-260
Gala	Imperial Gala	194-178	188-188	140-128	177-177	218-212	257-247	224-188	203-200	286-260
Gala	Galaxy (Unl.)	194-178	188-188	140-128	177-177	218-212	257-247	224-188	203-200	286-260
Gala	Pink Gala	194-178	188-188	140-128	177-177	218-212	257-247	224-188	203-200	286-260
Gala	Galaxy (V. Req)	194-178	188-188	140-128	177-177	218-212	257-247	224-188	203-200	286-260
Gala	Crimson Gala	194-178	188-188	140-128	177-177	218-212	257-247	224-188	203-200	286-260
Gala	Royal Gala N° 4	194-178	188-188	140-128	177-177	218-212	257-247	224-188	203-200	286-260
Verdes	ANA 6	184-184	188-188	166-140	168-157	218-212	255-255	228-203	224-205	260-235
Verdes	Granny Smith	184-184	188-188	166-140	168-157	218-212	255-255	228-203	224-205	260-235
Verdes	E. Granny Smith	184-184	188-188	166-140	168-157	218-212	255-255	228-203	224-205	260-235
Rojas	Stamp	184-184	216-188	140-136	177-177	218-212	257-247	203-199	224-223	236-236
Rojas	Scarlet Spur	184-184	216-188	140-136	177-177	218-212	257-247	203-199	224-223	236-236

Tabla 5. Continuación.

Grupo	Muestras	Marcador							
		CH04e03	CH02c11	CH02b07	CH02d08	CH03d07	CH04a12	CH03h03	CH01c06
Fuji	Raku-Raku	207-207	227-210	106-106	217-217	263-263	196-188	167-167	225-213
Fuji	E. Auvil Fuji	207-207	227-210	106-106	217-217	263-263	196-188	167-167	225-213
Fuji	Fuji Normal	207-207	227-210	106-106	217-217	263-263	196-188	167-167	225-213
Fuji	Blazer Fuji	207-207	227-210	106-106	217-217	263-263	196-188	167-167	225-213
Fuji	Jubilee	207-207	227-210	106-106	217-217	263-263	196-188	167-167	225-213
Fuji	Tigress	207-207	227-210	106-106	217-217	263-263	196-188	167-167	225-213
Fuji	Aztec	207-207	227-210	106-106	217-217	263-263	196-188	167-167	225-213
Fuji	Sun Fuji	207-207	227-210	106-106	217-217	263-263	196-188	167-167	225-213
Gala	B. Red Gala	207-207	227-210	113-104	259-231	251-211	215-202	167-167	227-215
Gala	BF-14	207-207	227-210	113-104	259-231	251-211	215-202	167-167	227-215
Gala	Gale Gala	207-207	227-210	113-104	259-231	251-211	215-202	167-167	227-215
Gala	Smith Gala	207-207	227-210	113-104	259-231	251-211	215-202	167-167	227-215
Gala	Simons Gala	207-207	227-210	113-104	259-231	251-211	215-202	167-167	227-215
Gala	Imperial Gala	207-207	227-210	113-104	259-231	251-211	215-202	167-167	227-215
Gala	Galaxy (Unl.)	207-207	227-210	113-104	259-231	251-211	215-202	167-167	227-215
Gala	Pink Gala	207-207	227-210	113-104	259-231	251-211	215-202	167-167	227-215
Gala	Galaxy (V. Req)	207-207	227-210	113-104	259-231	251-211	215-202	167-167	227-215
Gala	Crimson Gala	207-207	227-210	113-104	259-231	251-211	215-202	167-167	227-215
Gala	Royal Gala N° 4	207-207	227-210	113-104	259-231	251-211	215-202	167-167	227-215
Verdes	ANA 6	207-207	225-220	109-104	255-217	265-217	196-188	167-167	222-209
Verdes	Granny Smith	207-207	225-220	109-104	255-217	265-217	196-188	167-167	222-209
Verdes	E. Granny Smith	207-207	225-220	109-104	255-217	265-217	196-188	167-167	222-209
Rojas	Stamp	214-207	227-201	106-104	222-217	263-238	196-188	167-152	225-213
Rojas	Scarlet Spur	214-207	227-201	106-104	222-217	263-238	196-188	167-152	225-213
Rojas	ANA 8	214-207	227-201	106-104	222-217	263-238	196-188	167-152	225-213

Tabla 5. Continuación.

Grupo	Muestras	Marcador								
		CH03d10	CH04e05	CH03g07	CH05e04	CH01a09	CH01h02	CH01f02	CH01f07a	CH03d02
Jonagold	Excel	195-179-178	188-188	138-131-128	177-168	219-214	258-258	228-199-188	223-219-203	286-253-235
Jonagold	Red Jonaprice	195-179-178	188-188	138-131-128	177-168	219-214	258-258	228-199-188	223-219-203	286-253-235
Jonagold	Jonagored Supra	195-179-178	188-188	138-131-128	177-168	219-214	258-258	228-199-188	223-219-203	286-253-235
Jonagold	Jonagored	195-179-178	188-188	138-131-128	177-168	219-214	258-258	228-199-188	223-219-203	286-253-235
Pink Lady	Rosiglow	184-179	188-188	140-131	172-168	223-218	258-247	228-199	219-203	253-235
Pink Lady	Pink Lady (Uni)	184-179	188-188	140-131	172-168	223-218	258-247	228-199	219-203	253-235
Pink Lady	Pink Lady (V. Req)	184-179	188-188	140-131	172-168	223-218	258-247	228-199	219-203	253-235
Elstar	BEL-EL	195-179	213-188	128-128	ND	218-218	257-257	ND	ND	260-260
Venturia	Ana 12	195-184	235-213	140-128	177-168	218-212	257-257	228-188	219-219	253-253
-	African Red	184-178	216-188	138-136	177-168	219-218	258-247	199-188	223-203	286-236
Manzano Flor	Manchurian	195-184	218-206	178-124	177-172	218-218	ND	ND	ND	235-235
Braeburn	Braeburn	195-184	214-215	140-136	177-168	218-212	ND	ND	224-223	260-235
-	Sansa	184-178	188-188	131-128	177-177	219-218	257-247	188-188	218-200	260-236
-	Caudle	184-178	216-188	136-128	177-168	212-218	258-247	203-188	ND	286-236
-	Pink Rose	184-179	188-188	140-131	172-168	222-218	258-247	228-199	219-203	253-235
-	Sunshu	195-178	188-188	138-138	177-177	222-218	257-257	203-203	203-203	286-257
-	Washington Spur	184-184	216-188	140-136	177-177	218-212	257-247	203-199	224-222	236-236
-	Cordel	184-178	214-188	138-138	177-177	219-218	257-247	203-188	223-223	253-236
-	S. Gold Blush	184-179	218-188	140-128	177-168	219-218	257-255	199-199	222-203	253-235
-	Coromon del Red	184-178	216-188	138-138	177-177	219-218	257-247	203-188	223-223	253-236
-	x3318	184-184	214-188	138-138	177-168	222-218	257-255	228-203	224-219	236-236
-	x4982	184-178	233-188	136-128	177-177	218-212	257-257	228-188	223-203	260-236
-	x6938	184-179	228-214	131-128	177-168	219-214	ND	ND	223-216	260-253
-	Cybele	184-184	233-188	178-138	177-168	222-222	259-247	228-188	223-219	235-235
-	Verline	184-179	188-188	178-140	177-157	218-212	258-257	228-199	223-205	253-235
-	Baujade	179-179	188-188	166-128	168-168	218-205	258-255	ND	223-205	260-235
-	Everest	195-195	228-188	178-131	168-157	214-209	257-247	ND	219-219	235-235
-	sf 92092	195-184	214-214	140-136	177-168	218-212	247-257	228-199	224-223	260-235
-	Delkistar	184-179	216-188	136-131	177-168	218-218	257-247	228-203	224-218	236-236
-	Sundowner	184-184	216-188	140-136	177-157	212-212	255-247	199-192	223-205	235-235

Tabla 5. Continuación

Grupo	Muestras	Marcador							
		CH04e03	CH02c11	CH02b07	CH02d08	CH03d07	CH04a12	CH03h03	CH01c06
Jonagold	Excel	207-196	227-220-210	113-106-104	237-231	238-234-211	202-196	167-152	227-220
Jonagold	Red Jonaprince	207-196	227-220-210	113-106-104	237-231	238-234-211	202-196	167-152	227-220
Jonagold	Jonagored Supra	207-196	227-220-210	113-106-104	237-231	238-234-211	202-196	167-152	227-220
Jonagold	Jonagored	207-196	227-220-210	113-106-104	237-231	238-234-211	202-196	167-152	227-220
Pink Lady	Rosiglow	214-207	227-201	121-113	231-217	263-211	202-196	167-167	227-222
Pink Lady	Pink Lady (Uni)	214-207	227-201	121-113	231-217	263-211	202-196	167-167	227-222
Pink Lady	Pink Lady (V. Req)	214-207	227-201	121-113	231-217	263-211	202-196	167-167	227-222
Elstar	BEL-EL	201-201	227-215	104-104	259-228	238-238	216-216	167-152	227-220
Venturia	Ana 12	207-201	220-215	125-104	217-217	238-238	202-202	167-152	220-207
-	African Red	207-207	227-201	106-104	231-217	261-211	196-188	167-152	227-215
Manzano Flor	Manchurian	196-196	207-199	106-97	222-217	265-198	211-211	ND	222-207
Braeburn	Braeburn	214-207	227-201	104-104	259-222	263-238	196-178	167-152	227-227
-	Sansa	219-206	215-209	124-104	255-255	251-209	216-188	167-167	225-213
-	Caudle	214-207	227-227	106-104	231-217	263-211	196-188	167-152	225-220
-	Pink Rose	214-207	227-201	121-113	228-217	263-217	202-196	167-167	227-222
-	Sunshu	235-206	220-220	106-104	231-217	ND	196-188	167-167	227-222-215
-	Washington Spur	214-207	227-201	106-104	222-217	ND	196-188	167-152	225-213
-	Cordel	214-207	210-201	113-104	228-217	263-238	202-196	167-152	227-215
-	S. Gold Blush	207-207	231-227	106-104	228-217	238-217	202-196	167-152	227-215
-	Coromon del Red	214-207	210-210	113-104	228-217	263-238	202-196	167-152	227-215
-	x3318	207-207	227-227	106-104	217-217	263-238	196-188	167-152	222-209
-	x4982	207-207	227-209	104-104	259-217	234-211	216-196	167-167	227-215
-	x6938	207-196	220-210	109-104	231-231	ND	196-188	167-167	225-213
-	Cybele	207-207	220-210	124-113	231-231	238-211	199-196	167-152	220-207
-	Verline	207-207	227-227	104-104	231-217	ND	202-196	167-167	240-220
-	Baujade	207-207	225-210	104-104	259-217	263-211	196-188	167-167	222-213
-	Everest	207-207	ND	104-104	217-217	238-221	ND	ND	ND
-	sf 92092	214-207	227-201	104-104	ND	263-238	196-178	167-152	227-227
-	Delkistar	214-207	227-220	109-104	237-217	238-234	202-196	167-152	225-213
-	Sundowner	ND	201-201	ND	222-217	ND	196-188	167-152	225

En la gran mayoría de los patrones alélicos observados para cada cultivar, se observó de forma clara uno o los dos alelos, coincidente con una especie diploide, pero en los clones de la variedad 'Jonagold' fue posible observar la presencia de un tercer alelo en ocho de los 17 marcadores utilizados (Tabla 5). En la figura 3 se observa la presencia de estos tres alelos para uno de estos marcadores.

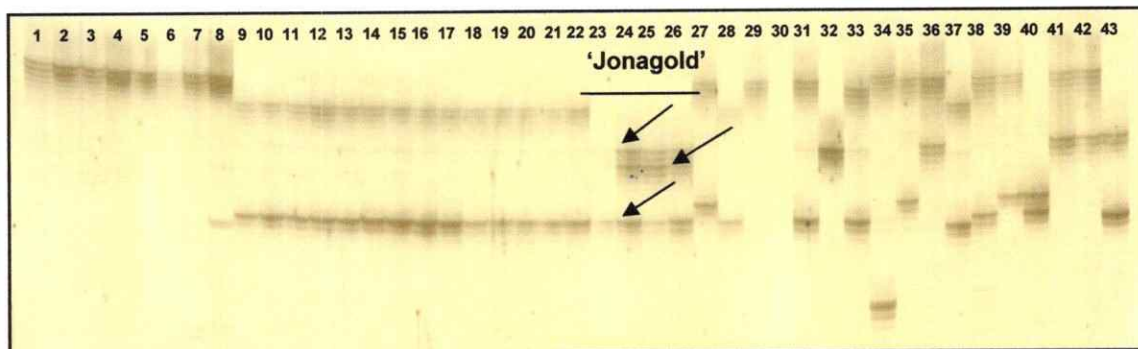


Figura 3. **Separación electroforética de los alelos del marcador CH03d07.** Se observa en los clones de 'Jonagold' la presencia de tres alelos (indicado por flechas). En todas las otras muestras analizadas en este gel se observa que cada uno cuenta con uno o dos alelos.

Orden de las muestras: 1) Raku-Raku, 2) E. Auvil Fuji, 3) Fuji Normal, 4) Blazer Fuji, 5) Jubilee, 6) Tigress, 7) Aztec, 8) Sun Fuji (1), 9) B. Red Gala, 10) BF-14, 11) Gale Gala (1), 12) Gale Gala(2), 13) Smith Gala(1), 14) Smith Gala(2), 15) Simons Gala(1), 16) Imperial Gala, 17) Royal Gala, 18) Galaxy (UV), 19) Galaxy (VR), 20) Crimson Gala, 21) Royal Gala N°4, 22) Pink Gala, 23) Excel, 24) Red Jonaprince, 25) Jonagored Supra, 26) Jonagored, 27) E. Granny Smith 28) Simons Gala (2), 29) Sun Fuji (2), 30) Bel-EI, 31) Rosiglow, 32) Ana 12, 33) African Red, 34) Manchurian, 35) Granny Smith(1), 36) Braeburn, 37) Sansa, 38) Pink Rose, 39) Granny Smith(2), 40) 41) Scarlet Spur, 42) Cordel, 43) Cybele. Muestra 30 no amplificó.

3.1.3 Análisis de diversidad genética.

La heterocigosidad esperada (H_e), la heterocigosidad observada (H_o), el número efectivo de alelos (A_e) y la frecuencia de alelos nulos (FR) fueron calculados de acuerdo a las distintas fórmulas mencionadas en materiales y métodos basados en la diversidad alélica y el número total de individuos analizados. Para estos análisis estadísticos, los cultivares clonales de los grupos 'Fuji', 'Gala', 'Verdes', 'Rojas', 'Jonagold' y 'Pink Lady' fueron representados cada uno como un solo cultivar. Esto se justifica por la homogeneidad alélica entre cada grupo de clones y porque utilizar todos los cultivares en forma separada causaría una distorsión de los datos de diversidad genética obtenidos con el resto de la colección. La tabla 6 muestra los resultados obtenidos.

Tabla 6. Estadígrafos para los 17 marcadores de SSR estudiados. Se incluye el número de alelos (A), número de individuos totales analizados, número de individuos heterocigotos, número efectivo de alelos (Ae), heterocigosidad observada (Ho), heterocigosidad esperada (He) y frecuencia de alelos nulos (FR) para los marcadores de SSR estudiados.

Marcador	Alelos (A)	Nº Ind. Totales	Nº Ind. Heterocigotos	Ae	Ho	He	FR(r)
CH03d10	5	29	21	3,36	0,72	0,70	-0,013
CH04e05	9	29	18	3,23	0,62	0,69	0,041
CH03g07	8	29	23	6,02	0,79	0,83	0,020
CH05e04	4	28	19	2,61	0,68	0,62	-0,036
CH01a09	8	29	23	3,67	0,79	0,73	-0,036
CH01h02	5	26	18	3,59	0,69	0,72	0,016
CH01f02	5	23	20	4,17	0,87	0,76	-0,062
CH01f07a	8	26	21	5,46	0,81	0,82	0,007
CH03d02	6	29	19	4,99	0,66	0,8	0,080
CH04e03	7	28	15	2,66	0,54	0,62	0,052
CH02c11	10	28	24	5,41	0,86	0,83	-0,015
CH02b07	8	28	20	3,44	0,71	0,71	-0,003
CH02d08	7	28	21	3,97	0,75	0,75	0
CH03d07	11	24	21	5,19	0,88	0,81	-0,038
CH04a12	7	28	25	3,50	0,89	0,71	-0,107
CH03h03	2	27	16	1,88	0,59	0,47	-0,085
CH01c06	9	28	25	6,74	0,89	0,85	-0,069
Promedio	7	27,4	20,5	4,1	0,75	0,73	-0,014

El número de alelos observados varió desde once (CH03d07), hasta un mínimo de dos alelos (CH03h03), H_o varió desde 0,89 (CH01c06) hasta un mínimo de 0,54 (CH04e03) y H_e varió desde un máximo de 0,85 (CH01c06) hasta un mínimo de 0,47 (CH03h03). Todos estos análisis y estadígrafos consideran sólo los datos obtenidos en un locus por cada marcador. Para aquellos marcadores de tipo multilocus, como por ejemplo CH02c11, el segundo locus no se consideró en el análisis (Figura 4), porque siempre fue monomórfico. Otros marcadores multilocus fueron CH01h02, CH01f02 y CH03h03 y se aplicó el mismo criterio que para el caso del marcador CH02c11.

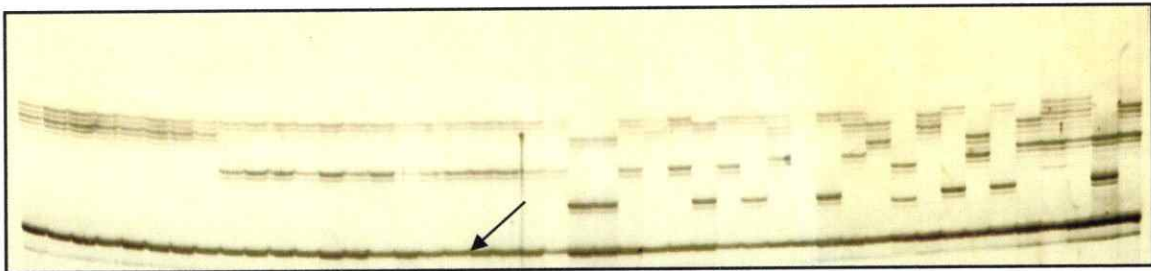


Figura 4. **Ejemplo de un marcador de SSR multilocus (CH02c11)**. El marcador amplifica para dos locus de SSR. La flecha indica la presencia del segundo locus, el cual no fue considerado al momento de realizar análisis con este marcador.

3.1.4 Determinación de la capacidad discriminatoria de los SSRs utilizados.

Conocidas las características de heterocigosidad de los 17 marcadores analizados, se buscó determinar qué marcadores y cuántos de ellos era necesario usar para identificar de forma confiable, el total de 56 cultivares de manzanos considerados, en este estudio. Sin embargo, para esto se procedió de manera similar que en los cálculos de heterocigosidad, considerando sólo los cultivares no clónales más un representante de cada grupo de clones, debido a que éstos al compartir el mismo patrón alélico son indistinguibles. Esto explica que el número de muestras considerado para esta parte del estudio disminuyó a 29.

Para este fin, primero se eligieron los “mejores marcadores” en base a dos características, valor de heterocigosidad esperada (H_e) y número de cultivares

analizados por marcador. Con estos criterios, se seleccionaron once de los 17 SSRs, los que presentaron un valor mínimo de H_e de 0,62 y al menos 28 cultivares analizados. Con esto se procedió a calcular la cantidad de genotipos observados por marcador (combinaciones de alelos para cada marcador), probabilidad de confusión (C_j) para cada uno de ellos, y finalmente el número de pares de genotipos no diferenciados. La tabla 7 muestra los valores obtenidos.

El mayor número de genotipos observados (18) se obtuvo con el marcador CH02c11, el que además presentó el segundo mayor número de alelos observados y el segundo valor más alto de H_e (0,83). En tanto que los valores más bajos correspondieron a CH05e04 con sólo ocho genotipos observados, el menor número de alelos (4) y el valor más bajo de H_e (0,62) de estos once marcadores.

De acuerdo a estos resultados el marcador CH02c11 es el mejor marcador para diferenciar entre los 29 cultivares del análisis. Sin embargo, con sólo usar este marcador quedarían nueve genotipos sin diferenciar, por lo que se requiere de un mayor número de SSRs para poder diferenciar los 29 cultivares. Para esto se realizaron combinaciones de marcadores y se comparó el valor teórico con el valor observado de números de pares no diferenciados (tabla 8) utilizando la fórmula descrita por TESSIER *et al.* (1999) descrita en materiales y métodos.

Se observa como disminuyó rápidamente el número de cultivares sin diferenciar a medida que se aumentó la cantidad de marcadores utilizados, hasta llegar al punto de que con tres SSR se puede diferenciar la mayoría de los cultivares. Sin embargo, no todos los cultivares fueron diferenciables, ya que se tiene el caso de cuatro cultivares ('Rojas' indiferenciable de 'Washington Spur' y 'Cordel' indiferenciable de 'Coromon del Red') que no son diferenciables con ninguno de los 17 marcadores utilizados. Acá existen tres posibilidades entre estos pares de cultivares: (1) los cultivares no pudieron ser diferenciados, por lo que un análisis con un mayor número de marcadores podría encontrar diferencias entre estos cuatro cultivares, (2) las muestras son clones entre sí de una variedad original, o (3) los cultivares sólo presentan diferencias en el nombre, pero en realidad son el mismo cultivar.

Tabla 7. Capacidad de diferenciación de cultivares de manzano de los 11 marcadores SSR más informativos.

Marcador	Nº cultivares	Nº alelos	He	Cj	Nº de genotipos observados	Nº de pares no diferenciados (valor observado)
CH02c11	28	10	0,83	0,154	18	10
CH03g07	29	8	0,83	0,135	16	13
CH03d02	29	6	0,8	0,169	14	15
CH01c06	28	9	0,85	0,117	12	16
CH02d08	28	7	0,75	0,223	12	16
CH02b07	28	8	0,71	0,261	11	17
CH04e05	29	9	0,69	0,282	11	18
CH04a12	28	7	0,71	0,262	10	18
CH03d10	29	5	0,7	0,27	10	19
CH01a09	29	8	0,73	0,243	10	19
CH05e04	28	4	0,62	0,361	8	20

Tabla 8. Capacidad de diferenciación de los marcadores SSRs de cultivares de manzanos. El mejor marcador obtenido en los análisis corresponde a CH02c11. Para aumentar la cantidad de genotipos diferenciados se le agregan nuevos marcadores, hasta completar los 11 seleccionados.

Combinación de Marcadores	Nº de pares no diferenciados		
	valor calculado (X_k)	valor observado	Valor corregido
CH02c11	62,524	10	8
CH02c11 + CH03g07	8,441	4	2
CH02c11 + CH03g07 + CH03d02	1,426	2	0
CH02c11 +... + CH03d02 + CH01c06	0,167	2	0
CH02c11 +... + CH01c06 + CH02d08	0,037	2	0
CH02c11+... + CH02d08 + CH01a09	0,009	2	0
CH02c11 +... + CH01a09 + CH04a12	0,002	2	0
CH02c11 +... + CH04a12 + CH02b07	6×10^{-4}	2	0
CH02c11 +... + CH02b07 + CH03d10	1×10^{-4}	2	0
CH02c11 +... + CH03d10 + Ch04e05	4×10^{-5}	2	0
CH02c11 +... + Ch04e05 + CH05e04	1×10^{-6}	2	0

Para el caso de los cultivares clonales 'Rojas' con 'Washington Spur' se puede afirmar en bases a información obtenida en listas de cultivares de distintos viveros que el segundo es un cultivar clonal al igual que el resto de los cultivares del grupo 'Rojas' estudiados. En el caso de 'Cordel' con 'Coromon del Red' la misma búsqueda permite confirmar que en realidad son el mismo cultivar, pero poseen distintos nombres (diferentes viveros extranjeros vende el cultivar 'Corodel' que también es llamado 'Coroman del Red', por lo que se puede inferir sólo diferencias en el nombre y que en realidad son los mismos cultivares). En la tabla 7 se observa un valor corregido para el número de pares no diferenciados que considera las dos situaciones mencionadas.

3.1.5 Análisis de similitud genética basados en SSR.

Para el análisis de los resultados obtenidos por SSR se utilizaron dos métodos de reconstrucción filogenética: (1) el método de parsimonia, que se basa en la optimización de los datos obtenidos, el cual entrega una hipótesis de reconstrucción filogenética que siempre involucra el menor número de pasos que expliquen estas relaciones, y (2) el método de vecino más cercano (Neighbor-Joining), que se basa en algoritmos de agrupamiento donde se estima la filogenia mediante la construcción de una matriz de distancia entre las taxas a analizar.

Cómo se ha mencionado más arriba, de los 56 cultivares considerados inicialmente estos análisis se concentraron en sólo 29 cultivares cuyos patrones alélicos fueron diferenciables. Con esto se obtuvieron dos árboles no enraizados, uno para cada método, lo que sugiere qué tan relacionado está un cultivar de otro de acuerdo a los datos obtenidos con los SSRs.

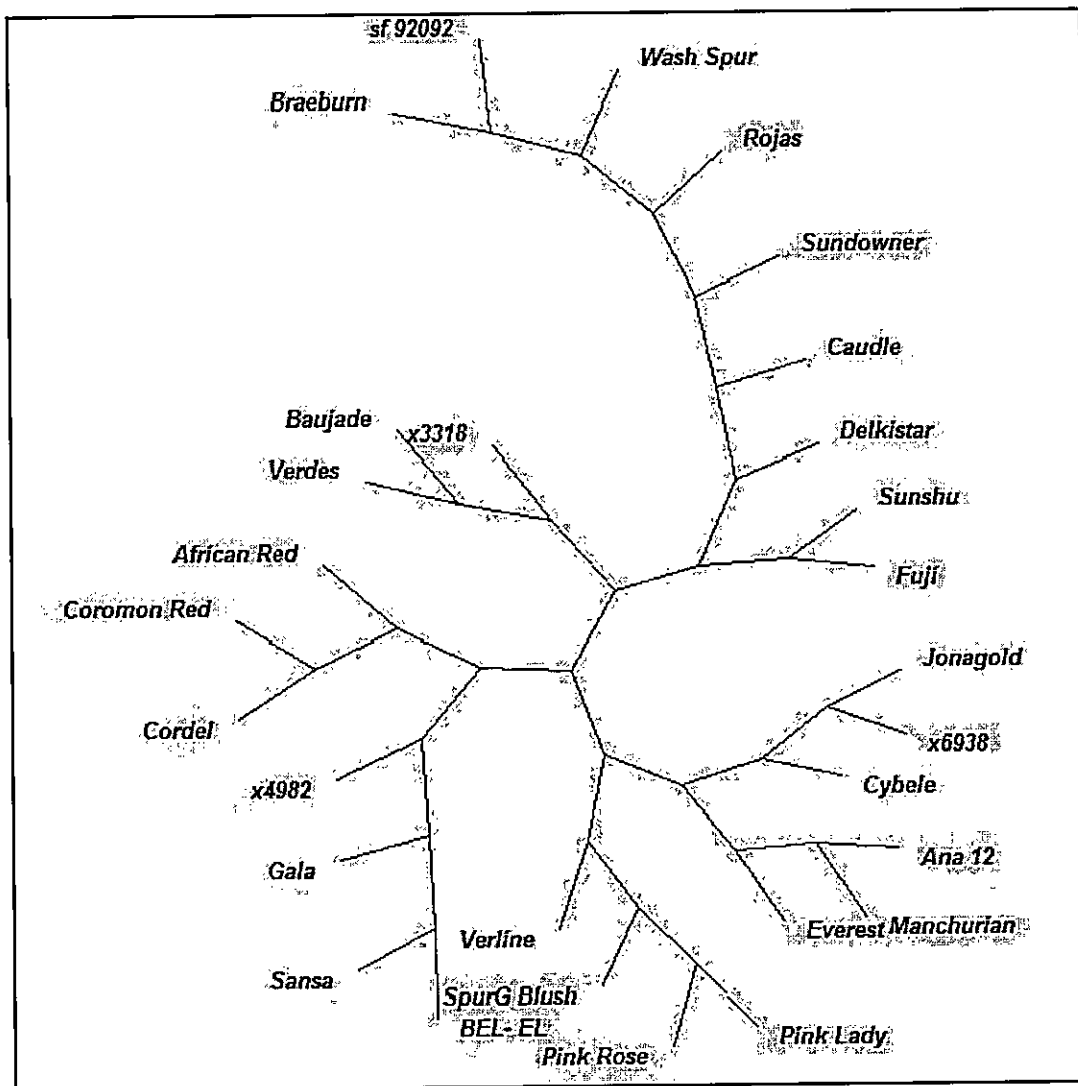
En el caso del árbol de parsimonia (Figura 5) se obtuvieron 18 árboles igualmente parsimoniosos (construidos con el mismo número de pasos, 388), un índice de consistencia (CI) de 0,3041 que indica qué tan bien los datos se ajustaron a la topología de los árboles, y un índice de retención de 0,4653 que indica los caracteres sinapomórficos que corresponden a caracteres homólogos originados a partir de un ancestro común.

Considerando uno de los 18 árboles parsimoniosos, la distribución de los cultivares se organizó en cuatro ramas distintas. Dentro de los grupos que poseen clones en la colección se encontró que los cultivares del grupo 'Gala' estaban más cercanos a los cultivares (líneas) 'x4982', 'Sansa' y 'Bel-el'. En el caso del grupo de clones 'Fuji' el cultivar más cercano fue 'Sunshu', el grupo 'Rojas' a 'Sundowner', el grupo 'Pink Lady' a 'Pink Rose', el grupo 'Jonagold' a 'x6938', y el grupo 'Verdes' a 'Baujade'. Dentro de los cultivares no clonales se observó que 'Cordel' quedó más próximo a 'African Red', 'Sansa' a 'Bel-el', 'Braeburn' con 'sf 92092', y finalmente 'ANA-12' con 'Manchurian'. Con respecto al resto de las variedades, ninguna presentó una relación tan cercana con alguno(s) de los cultivares de la colección.

Los resultados para el árbol no enraizado obtenido con el método de vecino más cercano (Figura 6) mostraron un alto nivel de coincidencia a lo obtenido con el método de parsimonia. Sin embargo, se evidenciaron pequeñas diferencias con el primero. Por ejemplo, el grupo de clones 'Rojas' en este árbol estuvo más cercano al cultivar 'Washington Spur', en vez del cultivar 'Sundowner'; por su parte, el grupo de clones 'Jonagold' se encontró más cercano al cultivar 'Cybele' en vez de 'x6938'.

La diferencia más drástica entre ambos árboles correspondió a la disposición de los cultivares 'ANA-12', 'Manchurian', 'Sansa' y 'Bel-el', que en el árbol de vecino más cercano se asociaron estrechamente entre sí, pero en el árbol de parsimonia los dos primeros cultivares se encontraron distanciados de los otros dos. El resto del árbol mostró un alto nivel de correspondencia en la distribución de los cultivares, como por ejemplo la cercanía entre los pares de cultivares 'Cordel' y 'Coromon del Red' (que se confirmó mediante búsqueda de estos cultivares en listas de viveros, ser el mismo cultivar), al igual que el cultivar 'Braeburn' y 'sf 92092'.

Figura 5. Árbol de parsimonia (uno de 18 árboles igualmente parsimoniosos) de los 29 cultivares analizados.



Tree length = 388

Consistency index (CI) = 0.3041

Homoplasy index (HI) = 0.6959

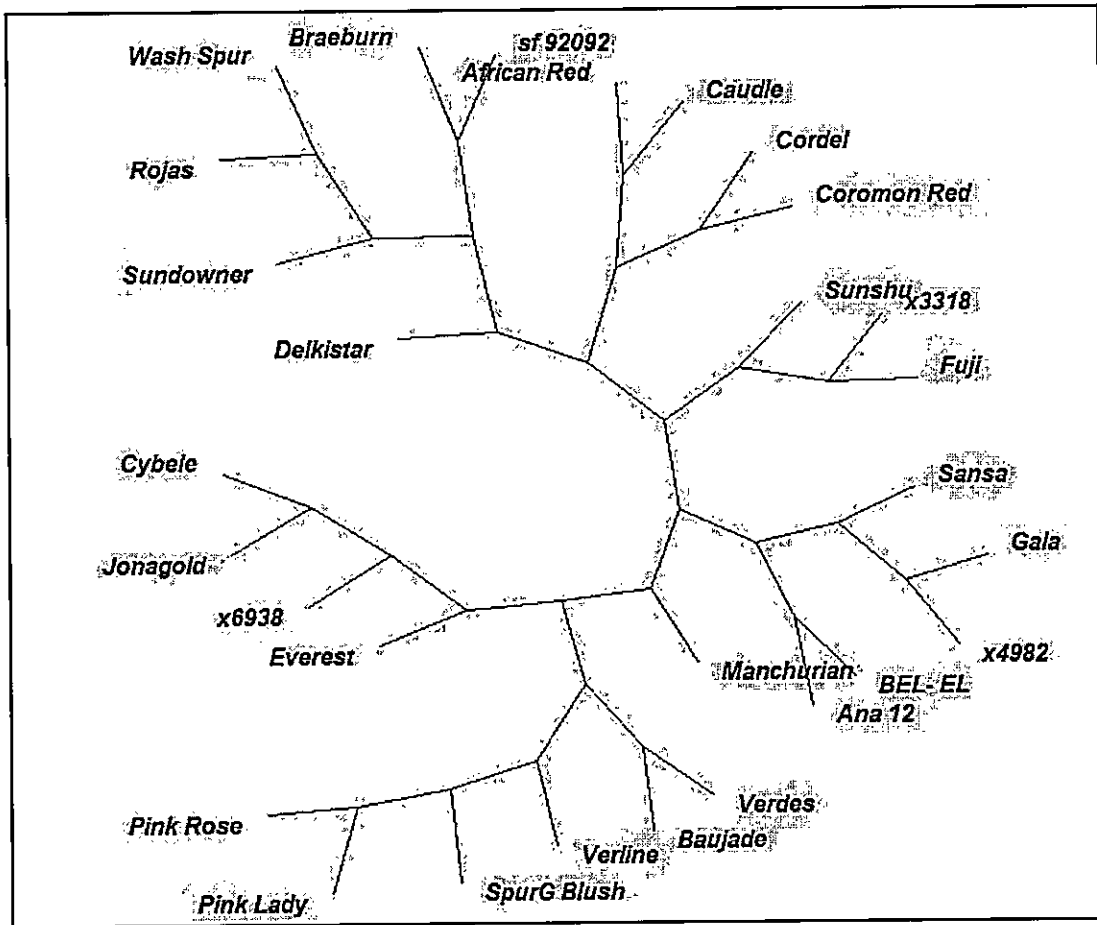
CI excluding uninformative characters = 0.2562

HI excluding uninformative characters = 0.7438

Retention index (RI) = 0.4653

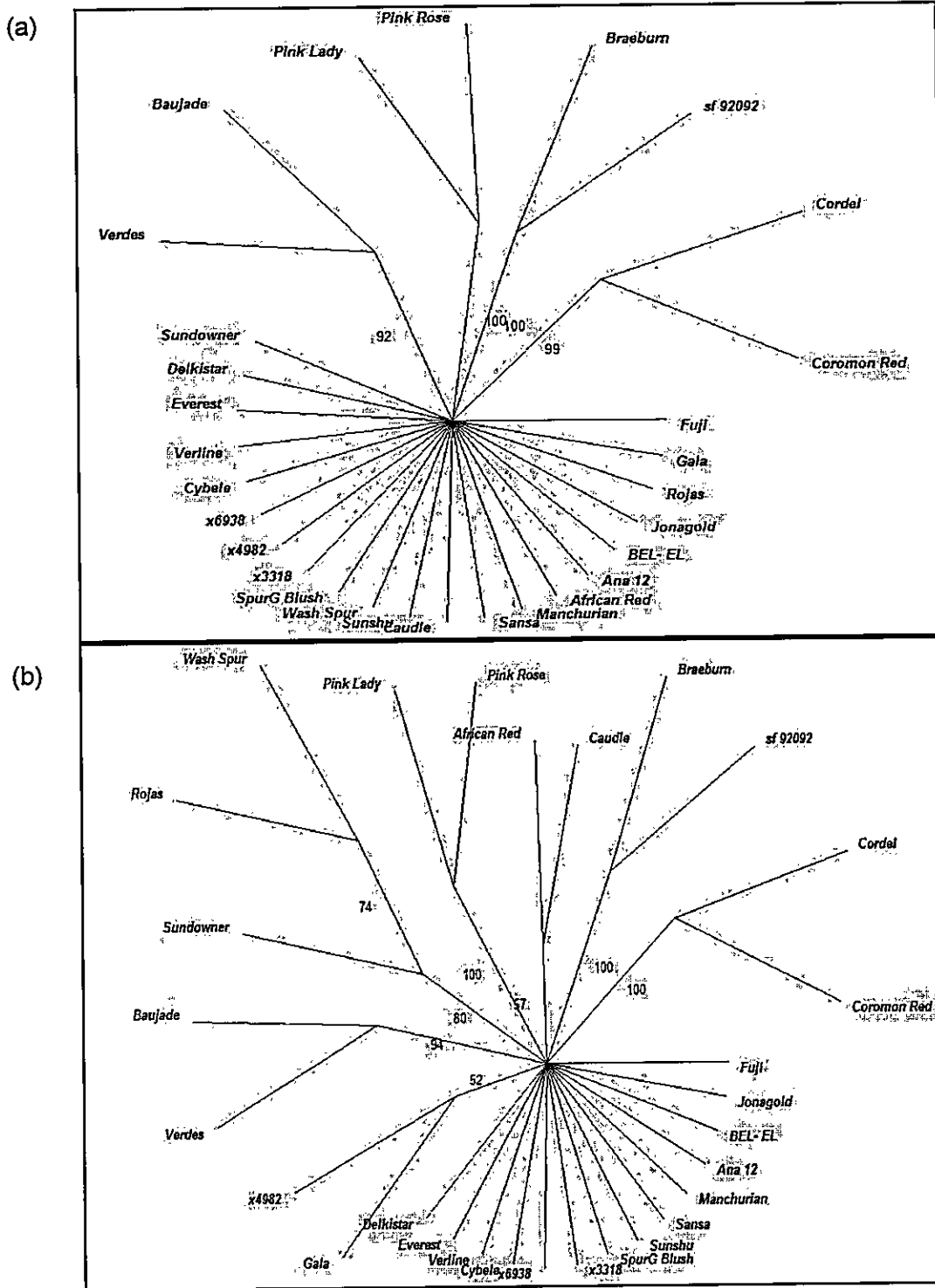
Rescaled consistency index (RC) = 0.1415

Figura 6. Árbol de vecino más cercano de los 29 cultivares analizados



Junto a estos análisis se realizaron pruebas de *bootstrapping* con los resultados del método de parsimonia (Figura 7a) y de "vecino más cercano" (Figura 7b). El *bootstrapping* consiste en un análisis que ejecuta cálculos repetitivos (árboles), pero sin variar el número de elementos de la muestra original, lo que permite estimar la distribución de las muestras a analizar y determinar si los valores obtenidos son sostenibles. En nuestro caso, si los grupos encontrados en las topologías tienen respaldo estadístico (valor máximo 100%). En el análisis de parsimonia se observan la identificación clara de cuatro grupos, todos con un valor muy alto de *bootstrap* (siendo el menor 92%). Sin embargo, la diferenciación de un mayor número de grupos cultivares no pudo ser confirmada, indicando que se requiere más información para poder establecer relaciones entre ellos. Para el caso del enfoque de "vecino más cercano", se observó correspondencia en el resultado con el análisis anterior, aunque se sumaron cinco cultivares más a la diferenciación con respecto a lo observado en parsimonia. Aquí los cultivares 'Caudle' y 'African Red' aparecieron agrupados pero poseen un valor de *bootstrapping* de sólo 58%. Por su parte, 'Rojas' y 'Washington Spur' se separaron del cultivar 'Sundowner' en otra rama con un valor de un 80%. El resto de los cultivares al igual que en el caso del *bootstrapping* de parsimonia requieren de más información para poder determinar similitud entre ellos.

Figura 7. (a) *Bootstrapping* de parsimonia y (b) *Bootstrapping* de vecino más cercano. En ambos casos se usaron 100 pseudoréplicas.



3.2 Análisis de amplificaciones de polimorfismos de secuencia específica (S-SAP)

El análisis de S-SAP se realizó solamente para los dos grupos de clones más grandes, 'Fuji' y 'Gala', debido a que encontrar diferencias que permitan identificar los clones de estos grupos es de un gran interés debido a la importancia comercial de estos cultivares, lo que como se dijo antes no fue posible de diferenciar usando marcadores de SSR. Para esto se tomaron dos muestras de cada cultivar (chequeada su identidad varietal por SSR), alcanzándose un número de 16 muestras para los ocho cultivares clonales de 'Fuji' y de 23 muestras para los doce cultivares clonales de 'Gala' (con 'Pink Gala' solo se utilizó una muestra). Además, para poder garantizar que existieran diferencias en la amplificación por S-SAP se agregó una muestra de los cultivares 'Excel' (grupo 'Jonagold'), 'Pink Lady' (grupo 'Pink Lady') y 'Early Granny Smith' (grupo 'Verdes').

3.2.1 Amplificación de fragmentos en S-SAP + 3

Antes de realizar las pruebas con S-SAP se verificó que el método de digestión de DNA, ligación de adaptadores, la preamplificación S-SAP+1 y la amplificación S-SAP+3, fuera exitosa y produjera un número no excesivo de fragmentos y de buena calidad (o sea, determinar si es necesario una dilución mayor o menor a 1:50 de acuerdo al protocolo explicado en materiales y métodos). Esto se puede chequear preliminarmente con un gel de agarosa para la reacción de PCR de S-SAP+3, cómo se observa en la figura 8 a modo de ejemplo.

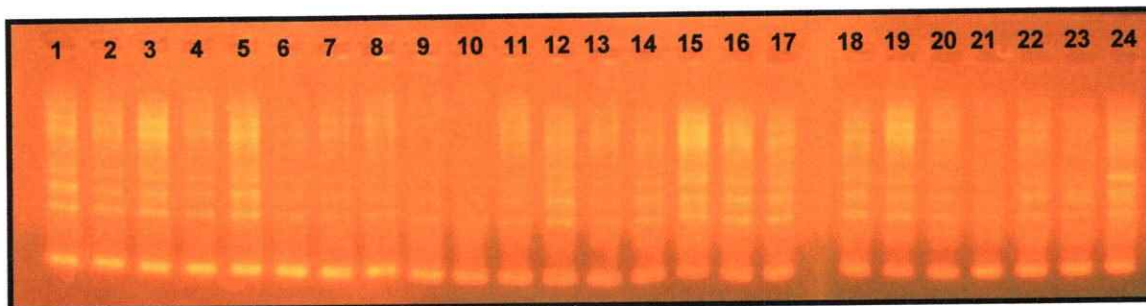


Figura 8. Gel de agarosa al 2% de una reacción de PCR de S-SAP+3 de la combinación de partidores LTR1 + C15.

Orden de las muestras: 1) B. Red Gala (1), 2) B. Red Gala (2), 3) BF-14 (1), 4) BF-14(2), 5) Gale Gala (1), 6) Gale Gala (2), 7) Smith Gala (1), 8) Smith Gala(2), 9) Simons Gala (1), 10) Simons Gala (2), 11) Imperial Gala(1), 12) Imperial Gala(2), 13) Royal Gala(1), 14) Royal Gala(2), 15) Galaxy (UV 1), 16) Galaxy (UV 2), 17) Pink Gala, 18) Galaxy (VR 1), 19) Galaxy (VR 2), 20) Crimson Gala (1), 21) Crimson Gala (2), 22) Royal Gala N°4 (1), 23) Royal Gala N°4 (2), 24) Excel.

Se puede observar en la electroforesis la presencia de un continuo de bandas de distinto tamaño, aunque destacan algunas de tamaño discreto de menor intensidad.

3.2.2 Detección de Polimorfismos con S-SAP

De las 16 combinaciones de partidores de S-SAP utilizadas, cuatro (LTR1+C2, LTR1+C3, LTR1+C12 y LTR1+C14) presentaron diversos problemas que van desde un excesivo número de bandas, problemas en el PCR debido a la combinación de partidores y problemas en la visualización de las bandas debido a su escasa definición en el gel de poliacrilamida. Con las doce combinaciones restantes se buscó diferencias claras y reproducibles entre cada grupo de clones y entre clones de cada grupo.

En la etapa inicial del análisis con estas 12 combinaciones de partidores no se encontraron diferencias sustantivas entre los clones tanto del grupo 'Fuji' como 'Gala'. Este resultado contrastó con la observación de diferencias intervarietales, al comparar las muestras de ambos grupos, confirmando que S-SAP es una aproximación capaz de distinguir claramente entre variedades. Para el caso de las muestras 'Excel', 'Pink Lady' y 'Early Granny Smith', estas fueron diferenciables entre sí y con respecto a 'Fuji' y 'Gala', aunque el porcentaje de bandas discriminantes fue más bien bajo. La figura 9

muestra un ejemplo de una separación electroforética de S-SAP, donde las flechas ilustran las diferencias entre 'Gala' y 'Fuji', y los círculos indican las diferencias entre clones de 'Gala'.

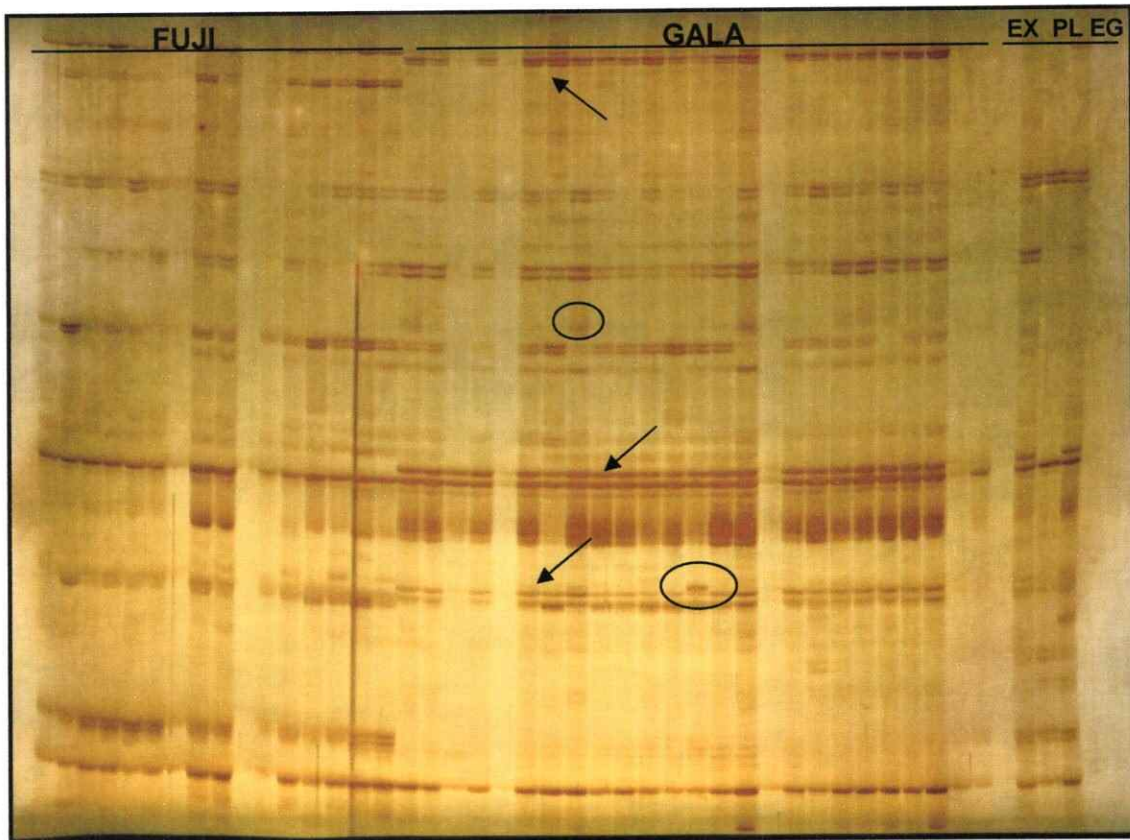


Figura 9. Patrones de amplificación de S-SAP para la combinación de partidores LTR1 + C13. Los amplicones se separaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 6% en condiciones desnaturantes. Se indica las muestras de los cultivares clonales del grupo 'Fuji' y las muestras del grupo 'Gala'. Además, se indica los carriles correspondientes a 'Excel' (EX), 'Pink Lady' (PL) y 'Early Granny Smith' (EG). Las flechas indican diferencias entre el patrón de 'Gala' con respecto a 'Fuji'. Enmarcadas en un círculo se ven algunas de las diferencias entre clones que se ven en la primera ronda de estudios.

Otro ejemplo, de búsqueda de diferencias mediante S-SAP se observa con la combinación de partidores LTR1 + C15. En este caso se vio un mayor número de bandas en la reacción de S-SAP que lo obtenido con los partidores LTR1 + C13 de la figura 9. Sin embargo, el resultado fue equivalente por cuanto no fueron distinguibles diferencias entre clones de una misma variedad de manera reproducible, observándose solamente diferencias entre las variedades (Figura 10).

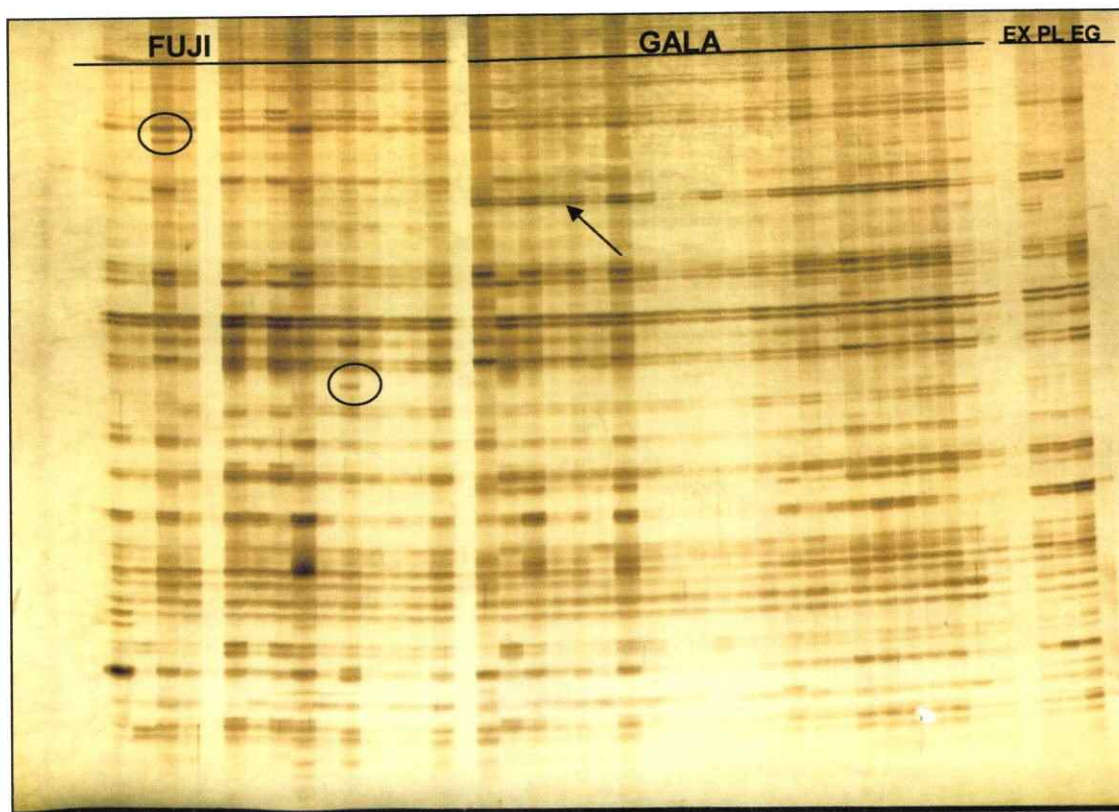


Figura 10. Patrones de amplificación de S-SAP para la combinación de partidores LTR1 + C15. Los amplicones se separaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 6% en condiciones desnaturalantes. Se indica las muestras de los cultivares clonales del grupo 'Fuji' y las muestras del grupo 'Gala'. Además, se indica los carriles correspondientes a 'Excel' (EX), 'Pink Lady' (PL) y 'Early Granny Smith' (EG). Las flechas indican diferencias entre el patrón de 'Gala' con respecto a 'Fuji'. Enmarcadas en un círculo se ven diferencias observadas en la primera ronda de estudios.

Como se mencionó con anterioridad, para verificar la autenticidad de las sutiles diferencias observadas entre algunos clones (principalmente del grupo 'Gala'), se repitió este mismo análisis con nuevas muestras de los mismos genotipos de los grupos 'Fuji' y 'Gala', analizando de esta manera las muestras obtenidas en dos temporadas distintas usando las mismas combinaciones de partidores de la primera ronda de experimentos.

Respecto de la reproducibilidad, se puede mencionar que un porcentaje altísimo de las bandas observadas se mantuvo exactamente igual entre las muestras de ambas temporadas. La figura 11 muestra la comparación entre dos experimentos realizados con la misma combinación de partidores (LTR1 + C4). La figura 11(a) corresponde al grupo original de muestras donde se tienen los clones de 'Fuji', clones de 'Gala' y los cultivares 'Excel', 'Pink Lady' y 'Early Granny Smith', mientras que la figura 11(b) corresponde a los clones de 'Fuji' y 'Gala' agregando nuevas muestras de los mismos árboles obtenidas en una segunda temporada

A pesar que, las muestras fueron digeridas con enzimas de restricción y completado el protocolo de S-SAP en tiempos distintos, se mantuvieron los mismos patrones de bandas principales (flechas de color negro), tanto para los clones de 'Fuji' como de 'Gala', algo que se observó también con otros partidores. Sin embargo, esta reproducibilidad no se mantuvo a nivel de las bandas menores, las que variaron en algunos clones.

Cómo una forma de comparar estos resultados con otros marcadores, se contó el número de bandas amplificadas para las 12 combinaciones de partidores de S-SAP utilizados para de esta forma tener una estimación del número de locis que es posible de analizar mediante S-SAP en estos cultivares de manzanos. La tabla 9 muestra los resultados.

Figura 11. Geles de poliacrilamida al 6% de una reacción de S-SAP para la combinación de partidores LTR1 + C4. (a) Muestras de los cultivares clonales del grupo 'Fuji' y las muestras del grupo 'Gala'. Además, las muestras correspondientes a 'Excel' (EX), 'Pink Lady' (PL) y 'Early Granny Smith' (EG), (b) Muestras de los cultivares clonales del grupo 'Fuji' y las muestras del grupo 'Gala' solamente. Las flechas indican la identidad en el patrón de 'Gala' y 'Fuji'.

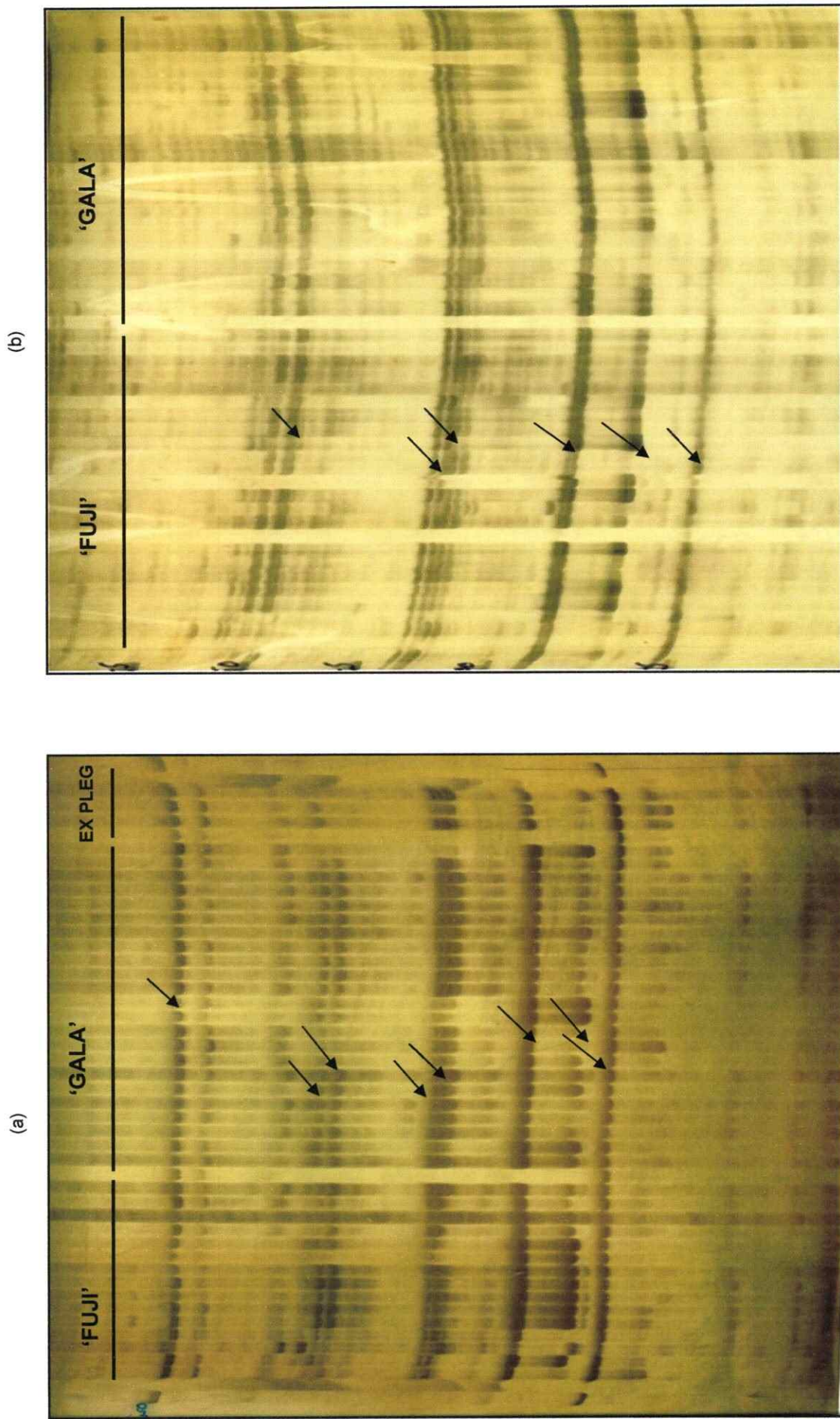


Tabla 9. Número de fragmentos amplificados por S-SAP para las distintas combinaciones de partidores utilizados en cada cultivar. Los cultivares analizados fueron el grupo clonal 'Fuji', grupo clonal 'Gala', 'Excel', 'Pink Lady' y 'Early Granny Smith'. Se indican los promedios de amplicones observados para cada combinación de partidores y para cada cultivar.

Partidores	Cultivares					Promedio partidores
	'Fuji'	'Gala'	'Excel'	'Pink Lady'	'Early Granny Smith'	
LTR1 + Msel C1	54	55	34	46	49	47,6
LTR1 + Msel C4	25	27	22	21	24	23,8
LTR1 + Msel C5	42	35	37	34	53	40,2
LTR1 + Msel C6	38	45	39	40	45	41,4
LTR1 + Msel C7	38	41	38	32	22	34,2
LTR1 + Msel C8	34	33	43	41	39	38
LTR1 + Msel C9	46	49	45	46	46	46,4
LTR1 + Msel C10	41	44	38	30	39	38,4
LTR1 + Msel C11	47	52	47	43	45	46,8
LTR1 + Msel C13	45	52	43	40	42	44,4
LTR1 + Msel C15	98	93	90	95	92	93,6
LTR1 + Msel C16	53	54	49	47	55	51,6
Total amplicones	561	580	525	515	551	546,5

El número de bandas fue muy variable entre las distintas combinaciones de partidores con un mínimo promedio de 23,8 bandas en la combinación LTR1 + Msel C4 y un máximo promedio de 93,6 bandas para la combinación LTR1 + Msel C15. A pesar de que en algunos caso se determinó el mismo número de fragmentos entre cultivares (por ej: El grupo 'Fuji' y el cultivar 'Excel' en la combinación LTR1 + Msel C11), todos los cultivares fueron diferentes en su patrón alélico para cada combinación de partidores. Sin embargo, cómo se mencionó con anterioridad, no fue posible encontrar diferencias entre los clones de los grupos 'Fuji' y 'Gala' respectivamente.

IV. DISCUSIÓN

4.1 Confirmación de la identidad genética de los cultivares.

La identidad de 42 de los 56 cultivares con los que se trabajó fue confirmada mediante el uso de tres marcadores de SSR, CH03d10, CHO3g07 y CH05e04, donde las muestras obtenidas por triplicado fueron idénticas. Sin embargo, para 14 cultivares restantes se encontraron diferencias en una de las muestras obtenidas por triplicado y en el caso del cultivar 'Tigress', diferencias con dos de las muestras. Fue entonces necesario realizar un remuestreo de estas muestras, pero por diversas dificultades sólo se re-muestreó ocho de los 14 cultivares (tabla 3). Una vez solucionado esto y confirmándose la identidad varietal de los cultivares se realizaron los distintos experimentos con marcadores moleculares.

4.2 Determinación de polimorfismos entre los cultivares.

4.2.1 Análisis de microsatélites (SSR)

Los 56 cultivares utilizados en este trabajo consistieron en cultivares únicos dentro de la colección de muestreo y también cultivares somaclonales derivados de una variedad original, por ejemplo clones de 'Gala'. Para esto se seleccionaron 20 marcadores de SSR, a partir de 140 marcadores ya conocidos para manzanos, de los cuales, 17 finalmente fueron los utilizados en esta tesis.

La confiabilidad de los marcadores utilizados fue probada por LIEBHARD *et al* (2002) cuando desarrollaron 140 nuevos SSR para manzanos con el fin de utilizarlos en el mapeo genético de los grupos de ligamiento del cruce entre 'Fiesta' x 'Discovery'. Desde la aparición de este trabajo, los SSR ahí descritos se han convertido en marcadores de uso estándar para el resto de los trabajos de identificación varietal en

manzanos. VENTURI *et al.* (2005), comprobaron la efectividad de un grupo de 24 marcadores de esta lista, de los cuales 10 fueron utilizados también en esta tesis (CH03d10, CH02c02, CH04e05, CH03g07, CH05e04, CH01a09, CH01h01, CH01d08, CH01f02 y CH01h02) pero dentro de este grupo se encuentran 3 marcadores, CH02c02, CH01d08 y CH01h01 que no dieron buenos resultados en su visualización en los geles de poliacrilamida, a pesar de que ellos en su trabajo pudieron determinar número de alelos y tamaños correctamente. ORAGUZE *et al.* (2005) utilizaron 5 marcadores de los 140 originales para la identificación de portainjertos de manzanos clónales. Aquí buscaron encontrar un análisis que permitiese la identificación eficaz debido a que aquellos basados en características morfológicas visibles presentan un alto nivel de dificultad debido al alto nivel de similaridad. RAMOS-CABRER *et al.* (2007) en su estudio de morfología y SSR en colecciones de manzanos españoles, utilizaron 9 de los 140 marcadores. Incluso se da el caso de YAMAMOTO *et al.* (2001) que utilizó 7 de estos marcadores en el análisis de 36 variedades de peras con buenos resultados.

Con los 17 marcadores de SSR con que se trabajó se pudo diferenciar sin mayores problemas la mayoría de los cultivares no clónales de la colección. Todos produjeron amplicones polimórficos de fácil detección, demostrando que los SSR en manzanos son marcadores muy informativos. Sin embargo, de los resultados obtenidos se concluye también, que los cultivares somaclonales no pudieron ser diferenciados con ninguno de los marcadores utilizados. Este resultado no es totalmente sorprendente ya que existe una gran cantidad de literatura sobre las dificultades de los SSR para diferenciar clones, no sólo en manzanos si no que en todo tipos de frutales. VENTURI *et al.* (2005) demostraron como los cultivares policlonales del tipo 'Gala' y 'Braeburn' fueron indistinguibles. En sus estudios compararon el cultivar original de 'Gala' con mutantes clónales como 'Ruby Gala', 'IG 31', 'Gala Must', 'Galaxy', 'Royal Gala' y 'Mondial Gala' y los cultivares 'Braeburn' y 'Hillwell', no lográndose diferenciar entre ellos a pesar de presentar una coloración distinta de sus frutos. HOKANSON *et al.* (1998) estudiaron una colección de 66 cultivares de manzanos de la *USDA-ARS Plant genetic Resources Unit's core collection*, logrando diferenciar indistinguiblemente 59 cultivares. De estos siete cultivares restantes que fueron indiferenciables, cinco correspondían a mutaciones somaclonales.

Otra situación frecuentemente observada en frutales, tiene que ver con el nombre de los cultivares. Es común observar cómo un mismo cultivar tiene distintos nombres dependiendo del lugar del mundo. Lo mismo ocurre cuando una variedad se le cambia el nombre para su uso comercial provocando confusiones y errores. GUARINO *et al.* (2006) estudiaron la diversidad genética mediante SSR de una colección de cultivares donde se sospechaba la presencia de una gran cantidad de "sinónimos", o sea cultivares que poseen distintos nombres pero que en realidad corresponden al mismo cultivar o son mutaciones somaclonales, encontrando que de 56 cultivares (8 de los cuáles se usaron como referencias) existían cuatro variedades originales que contaban con 25 cultivares "sinónimos" que no mostraban diferencias en el patrón alélico. De estos, 15 eran mutaciones somaclonales indistinguibles de una de estas variedades originales. Otros resultados similares fueron reportados por GUILFORD *et al.* (1997) y GOULAO Y OLIVERA (2001).

Dentro de las diferencias observadas en los patrones alélicos destaca la presencia de un tercer alelo en los cuatro cultivares del grupo 'Jonagold', característica que no comparte ninguno de los otros 52 cultivares estudiados. Los cultivares del tipo 'Jonagold' son consecuencia del cruce entre 'Golden Delicious' y 'Jonathan' realizados en el programa de mejoramiento de manzanos de la Universidad de Cornell, produciendo como resultado una variedad triploide, variedad que gracias a esto requiere de un polinizador debido a que produce una escasa cantidad de polen con muy poca viabilidad, es por esto que es un cultivar muy bien descrito con cerca de 70 cultivares derivados de mutaciones somaclonales existentes en el mercado [BROWN. 1997].

A pesar del alto nivel de reproducibilidad que se observa en los SSR de manzanos, es necesario buscar mejorar ciertos aspectos que presentan discrepancias entre los distintos trabajos, principalmente en lo concerniente al tamaño de los alelos y la presencia de multilocus en algunos marcadores. A modo de ejemplo, los clones de 'Gala' del trabajo de VENTURI *et al.* (2005) con el partidor CH04e05 presentan un solo alelo de tamaño 180 pb, para el mismo partidor RAMOS-CABRER *et al.* (2007) estimaron el tamaño de los clones de 'Gala' de su colección en 174 pb. Ambos valores son

menores al tamaño de 188 pb que se encontró para los doce cultivares clonales de 'Gala' estudiados en este trabajo. También, se observaron multilocus en marcadores no descritos originalmente en el trabajo de LIEBHARD *et al.* (2002). Por ejemplo el partidor CH02c011 que presenta dos locus fue originalmente descrito como un solo locus en el trabajo original, pero en esta situación no hubo mayores problemas ya que el otro locus no presentaba polimorfismos y claramente se podía ignorar en el análisis. Pero esta situación no es tan simple de resolver en otros casos como el partidor CH01h02, debido a que uno de los locus no se define de forma muy clara generando alelos que se mezclan con el otro locus, creando muchas dificultades para la asignación de los alelos de forma sencilla, situación que es notada también por GUARINO *et al.* (2006).

4.2.2 Análisis estadísticos de diversidad genética.

El número de alelos por locus con los 56 cultivares de manzanos presentó una variación desde un mínimo de dos alelos (CH03h03) hasta un máximo de once (Ch03d07) para un total de 119 alelos en los 17 locis observados, para una media de siete alelos. Este número es superior a lo reportado por GUILFORD *et al.* (1997) que observó una media de 4,5 alelos en su estudio de 21 cultivares de manzanos y bastante similar al promedio encontrado por Liebhard *et al.* (2002) que fue de 6,4 alelos por locus, pero es menor a lo visto por GIANFRASCESCHI *et al.* (1998) donde encontraron 8,2 alelos por locus y RAMOS-CABRER *et al.* (2007) que encontraron un número promedio de 12,4 alelos por locus.

En el caso de la heterocigosidad esperada (H_e) el promedio obtenido en este trabajo fue de 0,73; el mismo valor obtenido por ORAGUZIE *et al.* (2005) y muy cercano a lo reportado por GIANFRASCESCHI *et al.* (1998), y mayor a los valores de 0,62 y de 0,66 obtenidos por HOKANSON *et al.* (2001) y GUILFORD *et al.* (1997) respectivamente. Estos resultados en su conjunto muestran el alto nivel de heterocigosidad que se presenta la especie y que tan bien se ve reflejado aplicando análisis de SSR en manzanos. Este alto nivel de heterocigosidad existente en manzanos es debido a que

la auto-polinización es prevenida gracias a la auto-incompatibilidad gametofítica propia de esta y otras especies de la familia *Rosacea*. Las flores en manzanos presentan un sistema de auto-incompatibilidad que reduce la auto-fertilización gracias al control del crecimiento de los tubos polinizadores presentes en el pistilo. De igual forma el denominado gen S (un tipo de RNAasa) con sus múltiples alelos controlan la receptividad femenina a la auto-polinización [BROOHAERTS Y VAN NERUM, 2002]. Todo esto genera un alto nivel de heterocigosidad que es fácilmente detectable mediante los SSR.

4.2.3 Determinación del número óptimo de marcadores de SSR para una colección de manzanos.

Los cultivares de manzanos son una de las especies frutales más extendidas a nivel mundial con alrededor de 42 millones de toneladas métricas en la temporada 2005/2006 [FAS/USDA. 2007] y poseen no sólo una alta importancia económica, sino que presentan además, una muy alta diversidad, estimándose una cantidad de unos 7.500 o más cultivares. Es por eso necesario disponer de criterios de identificación que permitan la distinción clara de estos cultivares, ya que debido al amplio número existente, la identificación fenotípica clásica no es siempre efectiva, ni mucho menos.

Los marcadores moleculares son el método actual más poderoso para diferenciar entre cultivares y en su aplicación se recomienda utilizar el mayor número posible de éstos para poder lograr la identificación clara de un cultivar. Sin embargo, los marcadores moleculares tienen un alto costo lo que dificulta el poder realizar siempre un análisis con la mayor cantidad de marcadores posibles. Es así que se requiere de la optimización de los marcadores a utilizar para disminuir su número sin perder efectividad y confianza en la identificación realizada.

Con el objetivo de desarrollar herramientas de identificación basadas en análisis molecular y estadístico, TESSIER *et al.* (1999), crearon la forma de optimizar el número de marcadores moleculares usados basándose en la heterocigosidad esperada (H_e), también conocido como poder de discriminación. NARVÁEZ *et al.* (2001) realizaron la

identificación de los mejores SSRs de *Vitis vinifera* L. en 20 cultivares de vinos tintos y blancos, proponiendo una combinación de marcadores de SSR para fines de certificación de esas variedades.

Basados en estos antecedentes se buscó la mejor combinación de marcadores de SSR para manzanos, a partir de los 17 marcadores analizados. De acuerdo a una selección basada en el mayor número de cultivares con información de patrones alélicos y considerando el valor H_e de cada marcador, se eligieron once marcadores en este análisis. De aquí se concluyó que CH02c11 es el mejor marcador de este grupo de once SSRs, ya que permite la identificación del mayor número de genotipos (18) lo que se corresponde con su alto nivel de heterocigosidad esperada ($H_e = 0,83$). A este marcador se le fueron agregando otros marcadores de SSR (siempre en base al mayor número de genotipos observados y al H_e), hasta completar el total de once marcadores, lográndose diferenciar todos los cultivares no clónales de la colección ($n=23$).

Se encontró una situación particular en dos pares de cultivares ('Rojas' con 'Washington Spur' y 'Cordel' con 'Coromon del Red') los cuales no fueron posibles de diferenciar con ningún marcador molecular. Sin embargo, se puede afirmar con certeza que estos dos casos involucran a cultivares no diferenciables por ser clones de una variedad ('Rojas' con 'Washington Spur') y cultivares idénticos pero que tienen diferentes nombres ('Cordel' con 'Coromon del Red'). En base a esto es posible diferenciar todos los cultivares de la colección analizada con sólo tres marcadores de SSR (CH02c11, CH03g07 y CH03d02). Se debe destacar además, que estos tres marcadores presentaron amplificaciones nítidas en las corridas electroforéticas realizadas, lo que permite una fácil determinación de los distintos alelos (Figura 12).

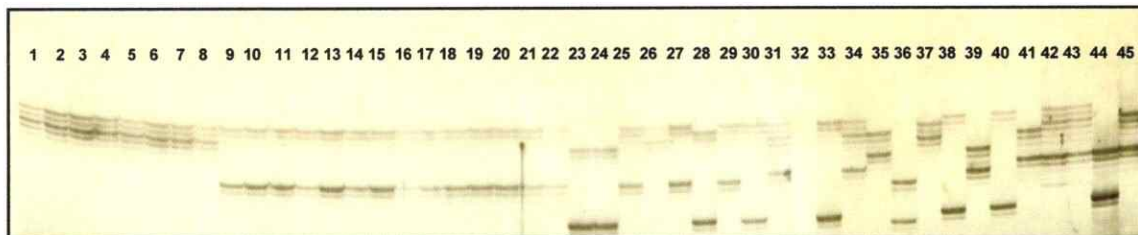


Figura 12. Separación electroforética de los alelos del marcador de CH02c11. Orden de las muestras: I) 1 a 8 clones de 'Fuji', II) 9 a 22, 25, 27 y 29 clones de 'Gala', 30) Scarlet Spur, 31) Excel, 32) Bel-El, 33) Rosiglow, 34) Red Jonaprince, 35) Ana 12, 36) Manchurian, 37) Granny Smith, 38) Braeburn, 39) Sansa, 40) Pink Rose, 41) x6938, 42) Jonagored Supra, 43) Jonagored, 44) Cordel, 45) Cybele.

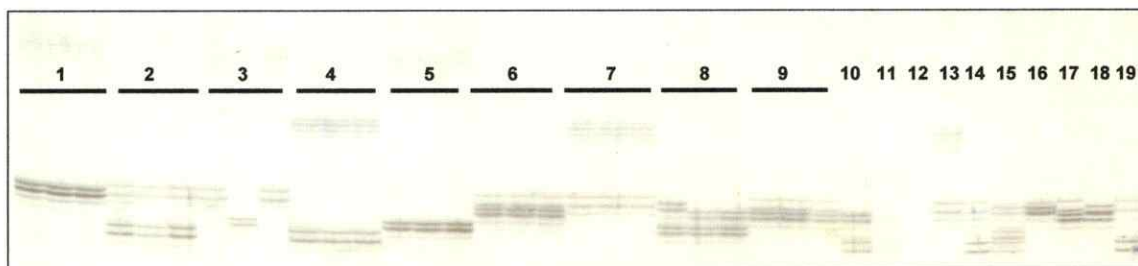


Figura 13. Separación electroforética de los alelos del marcador CH03g07. Orden de las muestras: 1) Cybele, 2) Royal Gala N°4, 3) Verline, 4) Baujade, 5) Everest, 6) SF 92092, 7) E. Granny Smith, 8) Delkistar, 9) Sundowner, 10) Raku-Raku, 11) E. Auvil Fuji, 12) N.A, 13) Ana 6, 14) Smith Gala, 15) Excel, 16) Rosiglow, 17) Ana 15, 18) African Red, 19) BF-14. Muestra 12 no amplificó. Prueba de muestras de tres árboles distintos. Se observan diferencias en una muestra en el cultivar Verline y Delkistar.

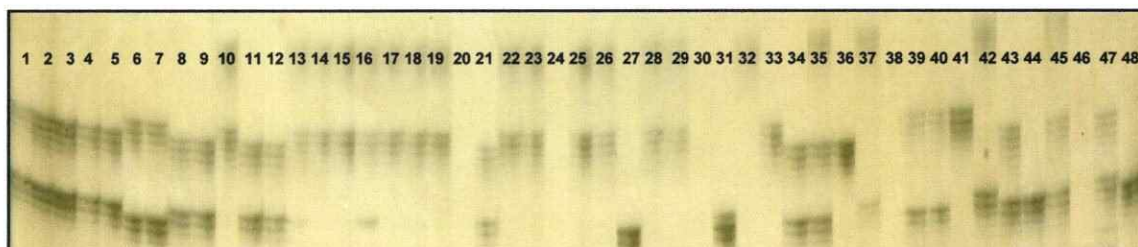


Figura 14. Separación electroforética de los alelos del marcadore de SSR CH03d02. Orden de las muestras: I) 1-5, 8-9 y 21 clones de 'Fuji', II) 10, 13-20, 22-26 y 28-29 clones de 'Gala', 6)Granny Smith, 7)E. Granny Smith, 27) Everest, 31) Scarlet spur, 32) Excel, 33) Bel-El, 34) Rosiglow, 35) Red Jonaprince, 36) Ana 12, 37) African Red, 39) Braeburn (1), 40) Braeburn (2), 41) Sansa, 42) Caudle, 43) Pink Rose, 44) Everest, 45) Jonagored Supra, 47) Cordel, 48) Cybele. Muestras 20, 24, 30, 38 y 46 no presentaron amplificación

4.2.4 Análisis de relaciones genéticas.

Los resultados de SSR permiten la comparación de los cultivares entre sí para la búsqueda de relaciones entre ellos. Para esto, los genotipos son agrupados en base a los estadígrafos más adecuados y se puede inferir que cultivar esta más o menos relacionado a otro.

En el caso del árbol obtenido mediante el método de parsimonia, las formas de construir un árbol a través del menor número de pasos pueden no ser únicas, por lo que es posible encontrar un mayor número de árboles que cumplan este requisito y no un árbol único. En este trabajo se encontraron 18 árboles igualmente parsimoniosos que fueron posibles de contruidos con 388 pasos. Esto no indica que uno sea mejor que otro, sino que cualquiera de los 18 árboles puede explicar la mejor relación de similitud entre las muestras (variedades) estudiadas. En este caso se obtuvieron topologías similares entre los 18 árboles.

Por lo tanto podemos ver que en los 18 árboles de parsimonia obtenidos se tiene un CI de 0,3041 indicando un nivel alto de homoplasia entre las muestras analizadas, es decir, que aunque presentan caracteres (alelos) similares entre las muestras, estos alelos pueden haber tenido una evolución independiente. Esto tiene sentido si se considera que aun cuando se describe un enorme número de variedades para la especie, el fitomejoramiento se ha centrado en un número mucho más reducido de genotipos parentales que se han entrecruzado numerosas veces, o bien podría dar cuenta que el número de progenitores ha sido más bien reducido, en el grupo de variedades analizadas en este trabajo. En ellos hay 22 cultivares que tienen como progenitor a 'Golden Delicious' (al menos 22 de los 56 cultivares, considerando que doce de los 56 cultivares son de origen desconocido o sus padres son mantenidos en reserva por derechos de propiedad intelectual). Otra variedad ampliamente usada en programas de fitomejoramiento es 'Red Delicious' usada en la creación de la variedad 'Fuji'.

El índice de retención es de 0,46 valor que no es alto, pero se encuentra dentro del rango de valores obtenidos en estudios similares que generalmente ronda entre un 0,4 a un 0,6 de índice de retención.

El árbol único obtenido por el método de vecino más cercano mostró un alto nivel de correspondencia con el de parsimonia, mostrando de esta forma consistencia de los datos colectados. Ambos árboles fueron construidos como árboles no enraizados, es decir no se infirió la presencia de un ancestro conocido dentro del grupo de muestras a analizar desde la cual divergieron del resto de variedades de la colección analizada. Es considerado habitualmente que los árboles no enraizados son más "correctos" (ajustados a la realidad) que los árboles enraizados, pero al no presentar un ancestro común pueden ser menos informativos que estos últimos.

En este trabajo se realizó un análisis con 100 pseudo-replicas, donde se observa la separación de cuatro grupos con un alto nivel de *bootstrapping* (sobre 95%). A pesar de esto, la mayoría de los cultivares no pudieron ser resueltos lo que indica que se requiere de más información para tener una buena reconstrucción filogenética o estimación de las relaciones genéticas entre las muestras de la colección, lo que se lograría con un mayor número de caracteres por muestra, lo que se logra utilizando un mayor número de marcadores de SSR para el análisis.

En trabajos similares de diferenciación de cultivares de manzanos, habitualmente se han presentado árboles filogenéticos para mostrar la similitud genética entre los cultivares, pero los resultados no siempre tienen relación con descriptores fenotípicos. Por ejemplo, GUARINO *et al.* (2006) estudiaron 48 cultivares de manzanos junto a ocho cultivares antiguos bien conocidos, realizaron un análisis de agrupamiento mediante UPGMA para crear un dendograma basado en distancias genéticas que no mostró una relación con características morfológicas de los genotipos estudiados. Por el contrario, HOKANSON *et al.* (1998) realizaron también un análisis basados en el algoritmo de agrupamiento UPGMA para encontrar relaciones genéticas entre sus cultivares, encontrando buena relación entre los datos genéticos con el *pedigree* descrito y los orígenes geográficos de los cultivares.

La comparación de resultados con lo obtenido por los dos trabajos antes mencionados es difícil, debido a que en ambos casos los cultivares estudiados son en su mayoría distintos a los utilizados en esta tesis. En el estudio por parte de GUARINO *et al.* (2006) de los 48 cultivares italianos de manzanos, ninguno de estos cultivares fueron utilizados en esta tesis y en el caso del trabajo de HOKANSON *et al.* (1998) sólo se coincide en los cultivares 'Granny Smith', un clon de 'Gala' y un clon de 'Fuji'. Esto no permite una comparación directa entre árboles filogenéticos entre los tres trabajos.

4.2.5 Análisis de diversidad intra-varietal mediante S-SAP.

Después de determinar que no era posible diferenciar clones mediante SSR, se utilizó una técnica de marcadores moleculares bastante reciente denominada S-SAP. Esta técnica, descrita originalmente por WAUGH *et al.* (1997) al buscar la distribución genética de elementos retro-transponibles del tipo *Bare-1* en cebada, consiste en una reacción de PCR que combina la metodología de AFLP con los conocimientos recientes de retro-transposones. En el citado trabajo encontraron un buen número de bandas polimórficas al analizar una población F1 de un cruce entre cultivares de cebada, que previamente había sido extensivamente mapeada con RFLPs, RAPDs y AFLPs. Otra característica observada, fue la presencia de un menor número de bandas que en AFLP, lo que facilitaba el trabajo sin perder información debido a la presencia de banda polimórficas.

A partir de este trabajo, el uso de S-SAP se extendió a otro tipo de plantas, incluidos los frutales, para buscar diferencias en variedades y cultivares indistinguibles con los marcadores moleculares de uso tradicional o encontrar nuevos métodos para su uso en mapeo. NAGY *et al.* (2003) utilizaron S-SAP para el mapeo genético y físico en el brazo del cromosoma 1RS de centeno. BRETÓ *et al.* (2001) uso S-SAP en mandarinas (*Citrus clementina*) para distinguir entre clones originados por mutaciones en cultivares propagados vegetativamente. RICO (2005) buscó nuevos retro-transposones en cítricos y utilizó S-SAP para la detección de estos elementos transponibles. En manzanos sólo el trabajo de VENTURI *et al.* (2005) se abocó a la

caracterización de clones mediante S-SAP con resultados auspiciosos para diferenciar algunos clones de las variedades 'Gala' y 'Braeburn'.

En este trabajo, sin embargo, no fue posible encontrar polimorfismos entre los clones de los grupos 'Fuji' y 'Gala', para una combinación de 16 partidores *Msel* con el partidador de retro-transposón LTR1 diseñado por VENTURI *et al.* (2005) a partir del único retro-transposón disponible de manzanos encontrado por YAO *et al.* (2001). Sí fue posible diferenciar claramente entre las variedades y los grupos clonales con los que se trabajó; 'Fuji', 'Gala', 'Excel', 'Pink Lady' y 'Early Granny Smith', pero en el caso de los clones las pocas diferencias que se encontraron en cada ensayo demostraron no ser reproducibles al realizar nuevas digestiones, ya sea con las mismas muestras obtenidas originalmente o con los nuevos muestreos obtenidos una segunda temporada. Esto se realizó también, un conteo de las bandas amplificadas por la reacción de PCR de S-SAP para cada una de las combinaciones de partidores, con un valor mínimo promedio de 23,8 bandas para la combinación LTR1 + *Msel* C4 y un valor máximo promedio de 93,6 bandas para la combinación LTR1 + *Msel* C15. Esto indica que en las reacciones de S-SAP se observa un número de locis significativos que pueden ser usados para distintos tipos de análisis genéticos de la especie, con cantidades de fragmentos amplificadas obtenidos similares o mayores a lo se puede obtener con AFLP.

Entre las medidas tomadas inicialmente para buscar mejor reproducibilidad estuvo el uso de enzimas de restricción que no fueran sensibles a la metilación, como lo es *Msel*, ya que diversos trabajos con AFLP han demostrado que utilizar una enzima de este tipo produce patrones de bandas diferenciales indeseables, más relacionadas a cambios epigenéticos que a modificaciones genéticas propiamente tales. XU *et al.* (2000) trabajaron con los isosquisómeros *HpaII* (sensible a la metilación) y *MspI* (no sensible a la metilación) encontrando una diferencia de hasta un 25% en el total de bandas de AFLP. También, siguiendo el protocolo de WAUGH *et al.* (1997) se realizaron digestiones dobles con las enzimas *EcoRI* y *Msel*, y no por separado como se hacen habitualmente en AFLP.

En conclusión, los resultados de S-SAP no fueron concluyentes, por lo que no se descarta la posibilidad de encontrar S-SAP en estos grupos de clones. Sin embargo, antes de proseguir estos análisis es necesario optimizar más la técnica de S-SAP para aumentar su reproducibilidad.

V. CONCLUSIONES

En este trabajo se analizaron 56 cultivares de manzanos con 17 marcadores de microsatélites (SSR), determinándose el patrón alélico y el tamaño en pares de bases de cada uno de ellos.

Los análisis estadísticos de los 17 marcadores utilizados mostraron un promedio de siete alelos por marcador y un valor de H_e promedio de 0,73, resultados que son similares a los encontrados en estudios de otras colecciones de manzanos.

Se identificaron los marcadores más efectivos para la diferenciación de cultivares de origen genético; con sólo tres marcadores (CH02c11, CH03g07 y CH03d02) es posible diferenciar a todos ellos, exceptuando a los cultivares clonales. Se realizaron también análisis de similitud genética mediante la construcción de árboles de parsimonia y de "vecino más cercano", con lo que se pudo agrupar los cultivares de acuerdo a su nivel de similitud.

El análisis con S-SAP confirmó las diferencias genéticas detectadas mediante marcadores SSRs entre cultivares de origen genético, pero no permitió establecer diferencias genéticas consistentes entre los cultivares o líneas clonales evaluados (grupos 'Fuji' y 'Gala'), aun cuando se analizó un número apreciable de amplicones, entre 515 para el cultivar 'Pink Lady' y 580 para los distintos cultivares de tipo 'Gala'.

En resumen, de acuerdo a la hipótesis planteada se comprobó que existe una alta heterocigosidad en el genoma de las distintas variedades de manzanos considerando los marcadores de microsatélite estudiados, lográndose identificar de forma exitosa los cultivares de origen genético. Sin embargo, no fue posible la diferenciación consistente entre cultivares originados por mutaciones somaclonales mediante el uso de marcadores moleculares basados en elementos móviles del tipo retro-transposón

VI. PROYECCIONES

- 1) La información generada en este trabajo se considera la suficientemente sólida desde el punto de vista científico, estando disponible para ser transferida a empresas especializadas en análisis genético, con el propósito de efectuar la identificación varietal de manzanos como un servicio, cuyos principales usuarios serían los productores de plantas (viveristas) y los productores y exportadores de fruta.
- 2) Considerando lo anterior, es deseable ampliar el estudio a un mayor número de genotipos, lo que permitiría generar una base de datos más amplia de distintas variedades de interés comercial y agronómico.
- 3) Para continuar la búsqueda de un sistema eficiente que logre diferenciar e identificar cultivares de origen clonal, sería deseable enfocarse en el análisis de genes candidatos y sus regiones de regulación, así como de factores de transcripción que puedan estar relacionados a caracteres usualmente variables entre clones, como color de piel y tamaño de frutos.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- ANTONIUS-KLEMOLA, K. KALENDOR, R. Y SCHULMAN, A. TRIM retrotransposons occur in Apple and are polymorphic between varieties but not sports. *Theor. Appl. Genet.* 112:999-1008. 2006.
- ASOEX (Asociación de exportadores de Chile A. G). Informativo Trimestral Asoex N°2. Enero-febrero 2007.
- BENNETZEN, J.L. Transposable elements contributions to plant gene and genome evolution. *Plant Molecular Biology.* 42:251-269. 2000.
- BRETÓ, M. P. RUIZ, C. PINA, J.A Y ASINS, M. J. The diversification of *Citrus clementina* Hort. Ex Tan., a vegetatively propagated crop species. *Mol. Phylogenet Evol.* 21: 258-293. 2001.
- BROOHAERTS, W. Y VAN NERUM, I. Apple self-incompatibility genotypes: an overview. *Acta Hort (ISHS).* 622: 379-387. 2003.
- BROWN, S.K. New York's food and life sciences bulletin #150. Cornell University. 1997.
- FAS/USDA (Foreign Agricultural Service, United States Department of Agriculture). World Apple Situation. Mayo 2007.
- GIANFRANCESCHI, L. SEGLIAS, N. TARCHINI, R. KOMJAC, M. Y GESSLER, C. Simple sequence repeats for the genetic analysis of Apple. *Theor. Appl. Genet.* 96: 1069-1076. 1998.
- GOULAO, L. Y OLIVERA, C. M. Molecular characterization of cultivars of Apple (*Malus x domestica* Borkh.) using microsatellites (SSR and ISSR) markers. *Euphytica.* 122: 81-89. 2001.
- GOULAO, L. CABRISA, L. OLIVEIRA, C.M. Y LEITAO, J.M. Comparing RAPD and AFLP analysis in discrimination and estimation of genetic similarities among apples (*Malus domestica* Borkh.) cultivars. *Euphytica.* 119: 259-270. 2001.
- GRZEBELUS, D. Transposon insertion polymorphism as a new source of molecular markers. *Journal of fruit and ornamental plant research.* 14:1. 2006.

- GUARINO, C. SANTORO, S. DE SIMONE, L. LAIN, O. Y CIPRIANI, G. Genetic diversity in a collection of ancient cultivars of Apple (*Malus X domestica* Borkh.). *Journal of horticultural science & biotechnology*. 81(1): 39-44. 2006.
- GUILFORD, R. PRAKASH, S. ZHU, J. M. RIKKERINK, E. GARDINER, S. BASSET, H. Y FORSTER, R. Microsatellites in *Malus x domestica* (Apple): abundance, polymorphism and cultivar identification. *Theor. Appl. Genet.* 94: 249-254. 1997.
- HALL, B. G. Phylogenetic trees made easy: a how-to manual for molecular biologist. Sinauer associates inc. Sunderland, Massachusetts. 2001.
- HOKANSON, S. C. SZEWC-MCFADDEN, A. K. LAMBOY, W. F. Y MCFERSON, J. R. Microsatellite (SSR) markers reveal genetic identities, genetic diversity and relationships in a *Malus x domestica* borkh. Core subset collection. *Theor. Appl. Genet.* 97: 671-683. 1998.
- JOSHI, S.P. RANJANEKAR, P.K. Y GUPTA, V.S. Molecular markers in plant genome analysis. *Curr. Sci.* 77: 230-240. 1999.
- KITAHARA, K. MATSUMOTO, S. YAMAMOTO, T. SOEJIMA, J. KIMURA, T. KOMATSU, H. Y ABE, K. Molecular characterization of apple cultivars in japan by S-Rnase análisis and SSR markers. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 130(6), pp. 885-892. 2005.
- KITCHING, I. A. FOREY, P.L. HUMPHRIES, C. J. Y WILLIAMS, D. M. Cladistics: The theory and practice of parsimony analysis. 2ª edición. Oxford university press. Great clarendon street. Oxford, New York. 1998.
- KOLLER, B. LEHMANN, A. MCDERMOTT, J. Y GESSLER, C. Identification of Apple cultivars using RAPD markers. *Theor. Appl. Genet.* 85, 901-904. 1993.
- KUMAR, A. Y BENNETZEN, J.L. Plant Retrotransposons. *Annu. Rev. Genet.* 33: 479-532. 1999.
- LIEBHARD, R. GIANFRANCESCHI, L. KOLLER, B. RYDER, C.D. TARCINI, R. VAN DER WEG, E. Y GESSLER, C. Development and characterization of 140 new microsatellites in Apple (*Malus X domestica* Borkh.). *Molecular Breeding.* 10:217-241. 2002.

- LODHI, M. YE, G-N. WEEDEN, N.F. Y REISCH, B.I. A simple and efficient method for DNA extraction from grapevine cultivars, *Vitis* species and *Ampelopsis*. *Plant Molecular Biology Reporter*. 12(1): 6-13. 1994.
- MARTINEZ DE TODA, F. Biología de la vid. Fundamentos biológicos de la viticultura. *Ediciones Mundi-Prensa*, Madrid. 1991.
http://www.acenología.com/ciencia56_5.htm
- MCKLINTOCK, B. Mutable loci in maize. *Carnegie Inst. Wash. Yearbook*. 47:155-169. 1948.
- MONCADA, X.; PELS, F.; MERDINOGLU, D.; HINRICHSEN, P. Genetic diversity and geographical dispersal in grapevine clones revealed by microsatellite markers. *Genome* 49, 1459-1472. 2006.
- NAGY, E. D. Y LELLEY, T. Genetic and physical mapping of sequence-specific amplified polymorphic (SSAP) markers on the 1RS chromosome arm of rye in a wheat background. *Theor. Appl. Genet.* 107: 1271-1277. 2003.
- NARVÁEZ, C. CASTRO, M. H. VALENZUELA, J. Y HINRICHSEN, P. Patrones genéticos de los cultivares de vides de vinificación más comúnmente usados en Chile basados en marcadores de microsatélites. *Agric. Téc.* 61: 3. 2001.
- NYBOM, H. Y SCHALL, B.A. DNA 'fingerprints' applied to paternity analysis in apples (*Malus X domestica*). *Theor. Appl. Genet.* 79: 763-768. 1990.
- ORAGUZIE, N.C. YAMAMOTO, T. SOEJIMA, J. SUZUKI, T. Y DE SILVA, H.N. DNA fingerprinting of Apple (*Malus* spp.) rootstocks using Simple Sequence Repeats. *Plant Breeding*. 124: 197-202. 2005.
- RAMOS-CABRER, A. M. DÍAZ-HERNÁNDEZ, M. B. Y PERERIRA-LORENZO, S. Morphology and microsatellites in Spanish Apple collections. *Journal of horticultural science & biotechnology*. 82(2): 257-265. 2007.
- RICO, L. Nuevos retro-transposones de naranjo. Desarrollo de marcadores basados en retro-transposones para la evaluación de la biodiversidad de los cítricos. Barcelona. Universitat de Barcelona. Facultat de Farmàcia. Departament de Bioquímica y Biología Molecular. 134 h. 2005.

- SANSVINI, S. DONATI, F. COSTA, F. Y TARTARINI, S. (2004) Advances in Apple breeding for enhanced fruit quality and resistance to biotic stresses: New varieties for the european market. *J. Fruit Ornam. Plant. Res. Special ed. Vol. 12*: 13-51.
- SUNAKO, T. SAKURABA, W. SENDA, M. AKADA, S. ISHIKAWA, R. NIIZEKI, M. Y HARADA, T. An allele of the ripening specific 1-aminoacyclopropane-1-carboxylic acid synthase gene (ACS1) in Apple fruit with long storage life. *Plant. Physiol.* 119: 1927-1303. 1999.
- SWOFFORD, D. L. PAUP* Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods). Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts. 1998.
- SZEWC-MCFADDEN, A. K. BLEIK, S. ALPHA, C. G. LAMBOY, W. F Y MCFERSON J. R. Identification of simple sequence repeats in *Malus* (apple). *HortScience.* 30: 855. 1995.
- TESSIER, C. DAVID, J. THIS, P. BOURSQUOT, J. M. Y CHARRIER, A. Optimization of the choice of molecular markers for varietal identification in *Vitis Vinifera* L. *Theor. Appl. Genet.* 98: 171-177. 1999.
- VENTURI, S. DONDINI, L. DONINI, P. Y SANSVINI, S. Retrotransposon characterization and fingerprintings of Apple clones by S-SAP markers. *Theor. Appl. Genet.* . 112(3): 440-444. 2005.
- WILEY, E. O. SIEGEL-CAUSEY, D. BROOKS, D. R. Y FUNK, V. A. The compleat cladist: A primer of phylogenetic procedures. The university of Kansas. Museum of national history. Special publication n° 19. 1991.
- XU, M. LI, X. Y SCHUYLER, S. K. AFLP-based detection of DNA methylation. *Plant molecular biology reporter.* 18: 361-368. 2000.
- YAMAMOTO, T. KIMURA, T. SAWAMURA, Y. KOTOBUKI, K. BAN, Y. HAYASHI, T. Y MATSUTA, N. SSRs isolated from Apple can identify polymorphism and genetic diversity in pear. *Theor. Appl. Genet.* 102: 865-870. 2001.
- YAO, J. DONG, Y. Y MORRIS, B. Parthenocarpic Apple fruit production conferred by transposon insertion mutations in a MADS-Box transcription factor. *PNAS.* 98(3): 1306-1311. 2001.