

Tesis de Posgrado

Caracterización molecular y cariotípica de la variabilidad genética de germoplasma argentino de *Solanum L.*

Marcucci Poltri, Susana N.

1998

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias
Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Marcucci Poltri, Susana N.. (1998). Caracterización molecular y cariotípica de la variabilidad genética de germoplasma argentino de *Solanum L.*. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3072_MarcucciPoltri.pdf

Cita tipo Chicago:

Marcucci Poltri, Susana N.. "Caracterización molecular y cariotípica de la variabilidad genética de germoplasma argentino de *Solanum L.*". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1998.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3072_MarcucciPoltri.pdf

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y
CARIOTÍPICA DE LA VARIABILIDAD
GENÉTICA DE GERMOPLASMA
ARGENTINO DE *Solanum L***

Trabajo de tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias
Biológicas.

Lic. en Ciencias Biológicas Susana N. Marcucci Poltri

Director: Dr. Horacio Esteban Hopp

1998

Lugar de trabajo: Instituto de Biotecnología, CICV, INTA
Castelar

A mis padres y hermanos



A Eric

A Lucía y Ana..

AGRADECIMIENTOS

Después de tantos años de compartir tanto, queda para el final de esta etapa completar la hoja de los agradecimientos, que dadas todas las características de este momento, no resulta fácil, especialmente debido a la falta de tiempo que generalmente acompaña este desenlace. Espero no olvidarme de muchas personas...

En primer lugar, le agradezco haber terminado este trabajo a mi director, Esteban Hopp, que hace mucho tiempo, gracias a su generosidad, permitió que ingresara al mundo de la biología molecular, que tanto anhelaba. Conocí a una gran persona y docente y gracias a él pude continuar desarrollando actividades y capacitándome. Facilitó todas las herramientas para que lograra culminar esta tarea. Me brindó su apoyo económico, para que trabajara en su laboratorio, científico, permitiendo discusiones enriquecedoras e interesantes, y más de una vez me socorrió con el tema cibernético, que tantos sustos me causó. Muchas gracias.

A Arturo Martínez siempre le agradezco que me haya estimulado en momentos difíciles, como es el nacimiento de un hijo, para que continuara trabajando y facilitarme las cosas para ello. Con él inicié mis becas y el camino del microscopio y pude relacionarme con todo el grupo que se desarrollaba en biología molecular, y que formé y formo parte actualmente.

A Daniel Ginzo, que siempre me ayudó con los análisis estadísticos y explicó sus conceptos, tan necesarios, de manera clara y concisa.

A Jorge Dubcovsky, que lo conocí hace muchos años, y que siempre acudí a su auxilio cuando me iniciaba en esta tarea, por sus consejos siempre pujantes y sus ópticas positivas. Después de mucho tiempo, sigo contando con él y es un placer poder participar en sus proyectos.

A Andrea Clausen que me entregó el material biológico, datos de pasaporte de las entradas y bibliografía adecuada.

A María Carolina Martínez, una de mis aprendices que me dio muchas manos en el laboratorio y más aún, varias veces se encargó de mis hijas con tanto cariño. Con la que cuento siempre. Gracias por tu amistad.

A Diego Lijavetzky, que me ayudó con varias cosas de esta tesis, análisis y discusiones científicas.

A Ceci Vazquez, Magdalena Rossi, y Dalia Lewi, por su amistad y charlas abundantes; científicas y no tanto.

A Mariana del Vas, Fabiana Biggi por todas las conversaciones de pasillo y detalles técnicos para que todo funcione bien. Por su amistad.

A Sebastian Arsurmendi, por sus auxilios cibernéticos en cualquier momento, no poco frecuentes.

A Oscar Taboga, Ceci Tami, Paula Cohen. Gracias por su compañerismo y por los viajes al INTA, que aún hoy los extraño.

A Daniela Tosto, Marcela Manifesto y Fernando Carrari por sus charlas de todo tipo y buena predisposición para la ayuda.

A Fenanda Ceriani, Paula Cramer y Sergio Feingold que me recibieron y guiaron en el laboratorio, hace mucho tiempo.

A Ruth Heins y Laura Moratinos, con las que compartí mi primer laboratorio en el IBM.

A Alejandro y Analía Tozzinni, Silvio Cravero, Laura Boschioli, María José Dieguez y Eleonora por sus interacciones.

A Osvaldo Rossetti, Angel Cataldi, Marisa Romano, Alicia Aresse Alejandro Escandón, Nilda López, Lela Carrillo, Dino Feingelstock, Erica Silverstein y Teresa por los días que compartimos en el IBM.

A mi nuevo director, Enrique Suárez, por transmitir siempre sus experiencias y comentarios y sus críticas.

A los más recientes colegas, Sandra Giancola, Eric Martinez, Maritza, Leonardo Ornella, Marcelo Helguera, Eduardo Guillin, Gabriela Calamante, Marisa Loóez, Marisa Farver,

A Norma Paniego, Mercedes Echaide por apoyo y amistad. Por las páginas de internet

A Ana Rosa Schlatter por sus apreciaciones, puntos de vista y buena predisposición a la cooperación de todo tipo, incluso de baby-sitter.

A Laura Bulrich, Silvina Lewis y Noga Zelener, con las que comparto el nuevo laboratorio, y con las que lo compartí hace mucho tiempo, cuando ingresé al INTA.

A Renee Fortunato, por su visión botánica y ayuda en algún poster que nunca hubiera terminado a tiempo.

A Norma Ompanera por su amistad y consejos.

A Isabel, Susana, Berta, por su cooperación.

A Marta, Anny, Eva, Perla, Mary y María Inés por su cooperación.

A Jorge Lorenzo, por todos los auxilios.

A las chicas de dibujo, Pedro y Rodríguez por su colaboración en distintas oportunidades.

Al Jardín Maternal, a sus maestras que cuidaron de mis hijas con cariño.

A Andrés... por todo.

A mi amiga Silvia, por soportarme igual.

A mis hermanos Graciela y Jorge, porque los quiero mucho

A Eric por existir.

A mi mamá y papá por la infinidad de veces que me apoyaron en todo y además me ayudaron con mis hijas, que de otro modo no hubiera podido. Por todo lo que siento por ellos.

A mis hijitas, por darle más razón a mi vida. Por que las amo con locura.

RESUMEN

La papa cultivada se encuentra relacionada con un gran número de especies del género *Solanum* con las que frecuentemente se cruza. Por tal motivo, las aproximadamente 200 especies silvestres que producen tubérculo, constituyen un importante reservorio de genes para distintos propósitos de mejoramiento. Las mismas se encuentran distribuidas en un amplio rango de hábitats y nichos ecológicos, constituyendo el Noroeste argentino, una gran fuente de germoplasma. Es conocido que poseen gran variabilidad tanto dentro como entre especies. La información sobre el grado de relación genética que existe entre las distintas entradas, reviste gran interés para las aplicaciones al mejoramiento genético, organización de los bancos de germoplasma, identificación de cultivares, reducción del número de entradas necesarias para que alberguen en una pequeña muestra, la mayor variabilidad genética posible, para el mejoramiento molecular, etc.

La variabilidad genética puede medirse utilizando distintas herramientas las que incluyen datos morfológicos, citológicos, bioquímicos y moleculares. El objetivo de este trabajo es evaluar la variabilidad genética de 67 entradas silvestres y cultivadas del género *Solanum*, coleccionadas en el Banco de Germoplasma de EEA INTA- Balcarce, aplicando metodologías citológicas y moleculares y contrastar los resultados obtenidos con la clasificación taxonómica y su hipótesis evolutiva. Se analiza la utilidad de estas herramientas y la información generada mediante los polimorfismos de restricción correspondientes a los ADNs ribosomales.

Se evaluó mediante microdensitometría, el contenido de ADN de individuos pertenecientes a 14 especies silvestres del género *Solanum* con el fin de detectar diferencias en el valor C. A pesar de que la mayoría de las especies no mostró diferencias significativas entre ellas (dentro de los distintos grupos de ploidías), pequeñas diferencias fueron detectadas entre algunas de ellas. *S. tarijense* y *S. kurzianum* (2,3 pg) difirieron significativamente (0,1%) de *S. spegazzini*, *S. vernei*, *S. venturii* y *S. commersonii* (1,9 pg); y *S. megistacrolobum* (2,2 pg) difirió de *S. spegazzinii* (1,9 pg) dentro de los citotipos diploides. Entre los tetraploides el rango fue desde 3,6 pg (*S. tuberosum* ssp *tuberosum* cv. Baraka) hasta 4,7 pg (*S. tuberosum* ssp *andigena* y *S. gourlayi*) hallándose diferencias significativas al 0,1%. En cuanto a la variabilidad de los genes que codifican para el ARN ribosomal, se detectaron diferentes tamaños de las subunidades completas, tanto dentro como entre especies, y aún, dentro de una misma especie; sugiriendo una alta tasa de mutaciones localizada fundamentalmente el extremo 5' del espaciador externo. La pérdida del sitio *EcoRI* del extremo 3' de dicho espaciador en todas las entradas de *S. venturii* fue característica de dicha especie.

El desarrollo de las nuevas metodologías ha expandido el rango de los ensayos para detectar polimorfismos de ADN con propósitos de "fingerprinting", distancias genéticas, etc. Se han desarrollado distintos marcadores moleculares (RFLP, AFLP, SSR etc) con el fin de estudiar las relaciones genéticas y se evaluó su utilidad en varios cultivos, incluidos la papa cultivada, *S. tuberosum* ssp *tuberosum*. En este trabajo, se ensayaron 4 combinaciones de "primers" de AFLP, 15 sondas genómicas de RFLP y 7 pares de "primers" para SSR; para un grupo de 67 genotipos diploides y poliploides que pertenecen al mismo grupo de especies silvestres y cultivadas. Se compararon

las asociaciones generadas mediante todas las técnicas y se las comparó con la clasificación taxonómica tradicional. Se calcularon los índices de contenido polimórfico promedios correspondiente a cada sistema (con valores aproximados de 0,25 para RFLP, 0,32 para AFLP y 0,58 para SSR), número de polimorfismos por ensayo y también se determinaron los alelos comunes entre las entradas diploides y poliploides, incluyendo al cultivar de papa.

En términos generales, las relaciones entre las especies variaron según la metodología utilizada. Se observó una gran variabilidad dentro de especies, lo que dificultó el establecimiento de las relaciones entre especies. Como se esperaba, las entradas pertenecientes a una misma especie, en general se agruparon con mayor similitud que entre especies, independientemente de la técnica utilizada. También se detectaron asociaciones de individuos concordantes con la procedencia geográfica. Promediando todos los índices de similitud obtenidos con los tres métodos, la especie que tuvo menor variabilidad fue *S. venturii* (0,681) y la de mayor variabilidad *S. gourlayii* (0,411).

Los mejores valores de correlaciones entre los distintos sistemas correspondieron a AFLP y SSR, en los dos grupos de ploidías, aunque los coeficientes de correlación entre las matrices de similitud obtenidas mediante las distintas herramientas no difirieron demasiado. Los valores de correlaciones en los citotipos diploides fueron desde 0,510 (RFLP vs SSR), 0,552 (RFLP vs AFLP), 0,640 (AFLP vs SSR). Considerando todos los citotipos independientemente de la ploidía, los valores oscilaron desde 0,441 (RFLP vs SSR), 0,505 (RFLP vs AFLP) a 0,629 (AFLP vs SSR).

Debido a los altos valores obtenidos en los coeficientes de correlación cofenéticos (matrices de similitud vs. matrices cofenéticas, AFLP $r=0.92$; SSR $r=0.85$; RFLP $r=0.78$), las asociaciones entre los individuos pueden visualizarse directamente a partir del dendrograma.

Los AFLP mostraron el mejor ajuste con la clasificación taxonómica, asociando dos especies que pertenecen a la misma serie *Yungasensa* (*S. tarijense* y *S. chacoense*), como así también agrupando más próximo al grupo de referencia externo tomate, a las entradas pertenecientes a *S. commersonii*, considerada como la especie más primitiva según la hipótesis propuesta por Hawkes, 1990. Esto quizás sea debido al gran número de bandas compartidas entre el germoplasma y a la alta cobertura genómica. En el caso de RFLP, se observaron algunos individuos dispersos, sugiriendo que sería necesario evaluar un mayor número de sondas.

Los SSR en general se utilizan para obtener información dentro de especies, pero no entre especies. Pudo observarse que la mayoría de los *loci* evaluados, produjeron amplificaciones, indicando la conservación de las regiones flanqueantes. Sin embargo, el número de repeticiones, no fue muy conservado entre las distintas especies, transformándolos en inapropiados para establecer relaciones entre especies, pero sí muy útiles dentro de especies.

El análisis reverso de los datos, permitió la detección de bandas características de especies y también de individuos. Casi todas las especies pudieron discriminarse con estas bandas, y muchos de los individuos mostraron bandas únicas. Se evaluaron asimismo el número de bandas novedosas respecto del cultivar Huinkul MAG, en especies como en individuos particulares, pudiendo identificarse aquellas más distantes genéticamente, que serían potencialmente interesantes para aumentar las bases genéticas de los cultivares comerciales. También se determinó el grado de homocigosis de los distintos genotipos

diploides, merced al uso de los marcadores de tipo codominantes (RFLP y SSR) mostrando un mínimo de homocigosis de 36% detectado en *S. spegazzinii* Oka 6108 y un máximo de 64% en *S. goniocalyx* y *S. megistacrolobum* Oka 3787.

ABSTRACT

Cultivated potato is related to a large number of *Solanum* sp and can easily be hybridized. This makes that the two hundred wild and cultivated tuber-bearing species of the genus *Solanum* form a valuable gene reservoir for different breeding purposes. They are distributed in a wide variety of habitats and niches (North-West Argentina is a source of a great number of these species), there is high genetic variation within and between species. Information on genetic relationships among accessions has several important applications for crop improvement: organizing germplasm banks, identifying cultivars, reducing the number of accessions needed to ensure a representative sample of broad range of genetic variability, molecular breeding, etc.

Genetic variability can be assessed in different ways including the comparison of morphological, cytological, biochemical and molecular data. The objective of this work is to evaluate genetic variability of 67 wild and cultivated *Solanum* accessions belonging to the germplasm bank of EEA INTA Balcarce, applying cytologic and molecular tools. The usefulness of these tools are compared with traditional taxonomy and its evolutive hypothesis. Ribosomal DNA coding sequences are explored through different restriction polymorphisms. Different subunits sizes were detected within and between species, and also in one specie, showing a high mutation rate mainly in the 5' end of the external spacer. All accessions of *S. venturii* showed the loss of an *EcoRI* restriction site located in the 3' end of the external intergenic spacer.

DNA content of individuals belonging to 14 wild *Solanum* species was measured by microdensitometry to determine differences in their C value. Although most species did not show significant differences between them, slight differences could be detected between some of the species. Both *S. tarijense* and *S. kurzianum* (2.3 pg) differ from *S. spgazzinii*, *S. vernei*, *S. venturii* and *S. commersonii* (1.9 pg); and *S. megistacrolobum* (2.2 pg) differ from *S. spgazzinii* (1.9 pg) at diploid level. Tetraploids ranged from 3.6 pg (*S. tuberosum* ssp *tuberosum* cv. Baraka) were found at 0.1% level.

New technological developments have expanded the range of DNA polymorphism assays for genome fingerprinting, genetic relatedness, etc. Different molecular markers (RFLP, AFLP, SSR, etc.) has been developed to study genetic relationships and their usefulness was compared in many crop species including cultivated potato *Solanum tuberosum* ssp *tuberosum*

In this work, 67 genotypes (diploids as well as tetraploids) belonging to the same group of wild and cultivated species, were assayed with, 15 RFLP genomic probes, 4 AFLP primers combinations and 7 microsatellite primers pairs. Associations generated by each technique were compared as well as how they fit with traditional taxonomy classification. Estimates of diversity indexes for each system (RFLP=0.25, 0.32=AFLP and 0.58=SSR), number of polymorphisms per assay as well as identification of common alleles between diploid and tetraploid accessions including cultivated potato were calculated.

In general terms, quantification of relatedness between species varied depending on the technique applied. It was observed a very high level of variation within species, making more difficult to establish relationships between species. As expected, accessions of the same species grouped at a higher level of similarity than with the rest of the germplasm, independently of the molecular tool used for evaluation. Genotypes belonging to the same

geographic origin, were also grouped. *S. gourlayi* showed to be the most variable specie calculated on the bases of the three methodologies with the with the smallest average similarity index (0,411) and the less variable was *S. venturii* with the highest average similarity index (0,681).

Similarity indexes calculated on the bases of all three different methodologies were correlated and r values were 0.510 (RFLP vs SSR), 0,552 (RFLP vs AFLP), 0,640 (AFLP vs SSR) for diploid species. Taking into account all citotypes, r values ranged from 0,441 (RFLP vs SSR), 0,505 (RFLP vs AFLP) a 0,629 (AFLP vs SSR).

As similarity matrixes are comparable with cophenetic matrixes (AFLP $r=0.92$; SSR $r=0.85$; RFLP $r=0.78$), this allows us to roughly visualize the associations between accessions directly on dendograms.

AFLP showed the best fit to taxonomic classification grouping two species (*S. tarijense* and *S. chacoense*) which belong to the same taxonomical serie *Jungasensa*, althogether; also *S. commersonii* which is considered to be the most primitive taxon of this group (Hawkes. 1990). was grouped near the outgroup tomato. This might be due to the higher proportion of shared bands respect to the other and the relative better coverage of genomes. In the case of RFLP, some accessions were dispersed, suggesting that more probes need to be analyzed.

SSR are usually used to obtain information within species and not between species, it was observed that the *loci* were conserved since amplification was possible in many of the genotypes analyzed. However, microsatellite *loci* showed very little conservation of alleles in different species (as expected for this very mutable *loci*) making them not appropriate for relatedness quantification when comparing different species, while they keep their usefulness within species.

Reverse analysis of data allowed the detection of specie specific bands as well as individuals ones. Nearly all of the species were able to be discriminated and most of single individuals had unique bands. Novel bands not found in potato cultivar Huinkul MAG were also computed in all species and in individuals allowing the knowledge of the more distant ones, which might be interesting for increasing genetic basis of commercial cultivars. Homozygous status of diploids genotypes were also estimated using codominant markers (RFLP and SSR) being of 36% for *S. spgazzinii* Oka 6108 and 64% for *S. goniocalyx* y *S. megistacrolobum* Oka 3787.

ABREVIATURAS

AFLP	Polimorfismos De Longitud De Fragmentos Amplificados
ANOVA	Análisis de la Varianza
Luc	Lucarini
NJ	Vecino Más Próximo
OKA	Okada
OTU	Unidad Taxonómica Operativa
RAPD	ADN Polimórfico Amplificado Al Azar
RFLP	Polimorfismos En La Longitud De Los Fragmentos De Restricción
RL	Restricción-Ligación
RB	Razón De Brazos
RBP	Razón De Brazos Promedio
SSR	Microsatélites
UPGMA	Ligamiento Promedio No Ponderado
UPOV	Unión internacional para la protección de obtenciones vegetales
Alt	Altitud
Centrom	Centrómero
Cm	Centi Morgan
CTAB	Bromuro De Cetometilamonio
Cv.	Cultivar
Dntp	Deoxiribonucleótidos
EDTA	Disodio-Metilendiaminotetraacetato
G.	Gramo
H.	Hora
Kb.	Kilobases
Kg.	Kilogramo
L	Litro
Lat	Latitud
Long.	Longitud
Mg.	Miligramo
Min.	Minuto
Mm	Milimolar
#	Número
MW	Marcador De Peso Molecular
Pb	Pares De Bases
Prom.	Promedio
PVP	Polivinil Pirrolidona
PI	Número De Introducción De Planta
Pg	Picogramo
Pmol	Pico Mol
Rpm	Revoluciones Por Minuto
Seg.	Segundo
St.	Desviación Estándar
TAE	Buffer De Electroforesis Tris-Acetato/EDTA
TBE	Buffer De Electroforesis Tris-Borato/EDTA
U	Unidades Enzimáticas
UI	Microlitro
Ug.	Microgramo
UV	Ultravioleta
V	Volt
W	Watt

INDICE

INTRODUCCIÓN

1. La Papa	1
1.1. Importancia del cultivo en la Argentina	1
2. Conservación de la biodiversidad y la variabilidad genética	2
2.1. Origen y análisis de la biodiversidad desde el punto de vista de la variabilidad genética	3
2.1. Conservación, evaluación y utilización de los recursos genéticos	3
2.2. Importancia de la papa como recurso genético	4
3. Estudios de la variabilidad genética y sus métodos de análisis	6
3.1. Aspectos morfológicos y clasificación taxonómica	6
3.1.1. Descripción del género <i>Solanum</i>	6
3.1.2. Clasificación taxonómica y observaciones botánicas de la sección <i>Petota</i>	7
3.1.2.1. Clasificación taxonómica de los genotipos analizados.	8
3.1.3. Distribución geográfica y centros de diversidad	10
3.2. Citogenética comparativa	11
3.2.1. Recuentos cromosómicos y cariotípicos	11
3.2.2. Contenido de ADN	13
3.3. Comparación de los patrones de variación de las unidades de repetición de los genes ribosomales	15
3.4. Marcadores genéticos	18
3.4.1. Marcadores morfológicos	19
3.4.2. Marcadores proteicos	19
3.4.3. Marcadores moleculares	20
3.4.3.1. RFLP	21
3.4.3.2. RAPD	23
3.4.3.3. Microsatélites o SSR	24
3.4.3.4. AFLP	27
4. Antecedentes de aplicación de marcadores moleculares en <i>Solanum</i>	30
4.1. RFLP	31
4.2. RAPD y Microsatélites	32
4.3. AFLP	33
Hipótesis de trabajo	34
Objetivo general	34
Objetivos parciales	35

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Material vegetal	36
1.1. Clasificación, distribución geográfica y citotipos	36
1.2. Mantenimiento y cultivo del material	43
2. Citología	43
2.1. Fuente de células	43
2.2. Recuentos Cromosómicos y Cariotípicos	44
2.2.1. Pretratamiento y fijación de las células	44
2.2.2. Tinción de cromosomas	44
2.2.3. Construcción de cariotipos	45
2.3. Medición del Contenido de ADN	46
2.3.1. Descripción de la técnica	46

2.3.2. Muestreo	46
2.3.3. Condiciones de los núcleos medidos	46
2.3.4. Condiciones del aparato	47
2.3.5. Precisión del aparato	47
2.3.6. Cuantificación del ADN	47
2.3.6.1. Patrones de ADN	47
2.3.6.2. Curva de hidrólisis	48
2.4. Nucleolos	48
3. Marcadores moleculares	48
3.1. Variación de los genes ribosomales	49
3.1.1. Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción	49
3.1.1.1. Sondas utilizadas	49
3.1.1.2. Extracción de ADN	49
3.1.1.3. Determinación de la concentración de ADN	50
3.1.1.4. Digestión, Separación de fragmentos y transferencia	51
3.1.1.5. Prehibridación, hibridación, lavados de astringencia y exposición	52
3.1.1.6. Reutilización de membranas	54
3.1.1.7. Cálculo de los pesos moleculares (PM)	54
3.1.2. Polimorfismos de los ITS mediante PCR	54
3.2. Variación de otros fragmentos genómicos mediante RFLP	56
3.2.1. Sondas utilizadas	56
3.2.2. Extracción de ADN y cuantificación	58
3.2.3. Digestión, separación de fragmentos y transferencia	58
3.2.4. Prehibridación, marcación, hibridación, detección, lavados de astringencia y exposición	58
3.2.4. Detección de las sondas marcadas	61
3.2.5. Reutilización de membranas	61
3.3. Análisis de los genomas mediante AFLP	61
3.3.1. Generación de AFLP	61
3.3.2. Separación y detección de AFLP	64
3.4. Análisis de los genomas mediante SSR o Microsatélites	65
3.4.1. Generación de SSR	65
4. Análisis de los datos	66
4.1. Generación de la matriz básica de datos	66
4.2. Generación de la matriz de similitud	66
4.2.1. Correlaciones entre matrices	67
4.2.2. Prueba de la diferencia entre dos coeficientes de correlación	67
4.3. Generación del dendrograma	67
4.3.1. Ligamiento mediante UPGMA	68
4.3.2. Ligamiento mediante Neighbor joining	68

RESULTADOS

1. Caracterización fenotípica del germoplasma analizado	70
2. Caracterización cariotípica	75
2.1. Descripción de los cariotipos	75
2.2. Cuantificación del contenido de ADN	81
2.2.1. Calibración del sistema	82
2.2.2. Establecimiento de un patrón de referencia:	82
2.2.3. Optimización del tiempo de hidrólisis de las preparaciones citológicas procedentes de las especies de <i>Solanum</i> y <i>Allium cepa</i>	86
2.2.4. Cuantificación del contenido de ADN de las especies de <i>Solanum</i>	87
2.3. Correlación entre el contenido de ADN y la longitud cromosómica:	90
2.5. Detección de nucleolos	92
3. Análisis de variabilidad de los genes ribosomales	93

3.1. Polimorfismos de longitud de la subunidad completa	93
3.1.1. Polimorfismos de longitud evidenciados con las endonucleasas de restricción <i>XbaI</i> y <i>PstI</i>	93
3.1.2. Polimorfismos de longitud evidenciados con la endonucleasa de restricción <i>EcoRV</i>	96
3.1.3. Polimorfismos de longitud evidenciados con la endonucleasa de restricción <i>BglI</i>	102
3.2. Polimorfismos de restricción	106
3.2.1. Polimorfismos de restricción evidenciados con la endonucleasa <i>EcoRI</i>	106
3.2.2. Polimorfismos de de restricción evidenciados con la endonucleasa <i>DraI</i>	112
3.3 Polimorfismos en el espaciador intragénico	117
4. Análisis y cuantificación de la variabilidad genética en <i>Solanum</i> basándose en marcadores moleculares selectivamente neutros	119
4.1. RFLP	119
4.1.1. Construcción de la Matriz Básica de Datos	121
4.1.2. Número de alelos presentes en las entradas	125
4.1.3. Índices de contenido polimórfico de cada sonda de RFLP.	128
4.2. AFLP	129
4.2.1. Construcción de la Matriz Básica de Datos	131
4.2.2. Número de loci polimórficos por entrada	137
4.2.3. Índice de contenido polimórfico promedio por combinación de oligonucleótidos selectivos	139
4.3. MICROSATELITES	140
4.3.1. Construcción de la Matriz Básica de Datos	141
4.3.2. Variabilidad de los microsatélites	145
4.3.3. Índice de contenido polimórfico por combinación de oligonucleótidos.	147
4.4. Comparación de la eficiencia relativa de los distintos marcadores moleculares empleados para detectar variabilidad genética en papa	150
4.5. Estimación de la distancia genética entre la papa cultivada y su germoplasma relacionado basado en las bandas compartidas	152
4.6. Distribución de alelos en los loci sinténicos de RFLP y SSR.	154
4.7. Potencial genético de las especies silvestres:	156
4.7.1. Alelos novedosos de cada microsatélite en taxones simulados	165
4.8. Grado de homocigosis de las entradas	166
4.9. Índices de Contenido polimórfico promedio	168
4.10. Correspondencia entre los sistemas	169
4.11. Dendrogramas de las especies analizadas	172
4.11.1. Dendrogramas generados mediante cada técnica molecular por separado	172
4.11.2. Dendrogramas generados mediante todas las técnicas moleculares conjuntamente	176
4.12. Distribución de los índices de similitud	179
4.13. Índices de similitud promedio dentro de especies	181
4.14. Índices de similitud promedio entre especies	182
4.14. Similitud entre OTUs (especies) simuladas:	184
5. Técnica R: Análisis de las variables:	188

DISCUSIÓN

1. Evaluaciones fenotípicas	197
2. Diferenciación citológica	200
2.1. Cariotipos	200
2.2. Contenido de ADN	201
3. Constricciones secundarias y genes ribosomales	205
4. Marcadores moleculares	208

4.1. Alelos comunes entre el germoplasma y la papa cultivada	211
4.2. Correspondencia entre los sistemas:	212
4.3. Topología de los dendrogramas	212
4.3.1. Aplicación del método de UPGMA	213
4.3.2. Aplicación del método de Neighbor-joining	214

CONCLUSIONES

CARIOTIPOS Y CONTENIDO DE ADN	215
VARIABILIDAD DE LOS GENES RIBOSOMALES	215
VARIABILIDAD DEL GENOMA	216
ASOCIACION DE VARIABLES	218
EVOLUCION DE LAS ESPECIES USANDO EL ALGORITMO DE "NEIGHBOR JOINING" Y DATOS MOLECULARES DE AFLP, RFLP Y SSR	218

REFERENCIAS	220
--------------------	------------

INTRODUCCIÓN

1. La Papa

La papa es uno de los cultivos más antiguos de la humanidad y es indudablemente originaria del nuevo mundo, habiendo sido llevada a Europa a fines del siglo XVI, después del descubrimiento y conquista del Perú. Estudios arqueológicos y de cerámicas revelan que ya se cultivaba desde el comienzo de la era Cristiana.

El cultivo de papa está ampliamente distribuido en el mundo y es el cuarto en importancia de producción de alimento luego del trigo, maíz y arroz. De los cultivos de tubérculo y/o raíz, es el primero; seguido por la mandioca y la batata. También cabe destacar que la producción mundial excede la de muchos cereales como cebada, sorgo, mijo, arroz y avena, en ese orden (Hawkes, 1990).

Entre sus propiedades nutritivas puede mencionarse el contenido proteico, rico en aminoácidos esenciales comparables a los de la leche (Ross, 1986). Como cultivo es interesante desde el punto de vista de su propagación clonal, que permite que cultivares seleccionados para diversas características sean mantenidos sin modificación genética ya que no requiere de la segregación meiótica de alelos.

Las estadísticas de consumo disponibles demuestran que existe un amplio espacio potencial para incrementar la participación de la papa en la alimentación primaria de los países en desarrollo. Así, mientras el consumo anual *per capita* en América Latina está por debajo de los 10 kg., en los países desarrollados éste es de 50 a 80 kg. Una de las limitaciones más grandes de la producción es de índole económica. Debido a las condiciones imperantes en los países en desarrollo, la papa es considerada una producción de "alta inversión". Por esta razón, muchos pequeños productores no pueden reunir los medios para comprar los insumos necesarios para mejorar los rendimientos, tales como papa-semilla de buena calidad, fertilizantes y herbicidas (FAO, 1991).

1.1. Importancia del cultivo en la Argentina

La producción de papa está destinada principalmente al mercado interno. El consumo anual *per capita* es uno de los más altos de Latinoamérica (61,2 kg). La principal región de producción está localizada en el Sudeste de la Provincia de Buenos Aires, aunque también existen zonas de cultivo en la región Central y Noroeste del país. En estas últimas, las condiciones climáticas permiten la realización de dos cosechas anuales. La superficie total dedicada a esta cosecha fue de 115.000 ha en 1989, (FAO, 1991) registrándose una producción total de 1.836.000 tn y un rendimiento promedio de 24,7 ton/ha. Del área sembrada, unas 15.000 ha están dedicadas a la producción de papa-semilla. Las variedades más utilizadas para el consumo son Spunta (cerca del 60% del mercado), de origen holandés, Huinkul MAG, desarrollada en Argentina y otras variedades como Kennebec y Bonaerense la Ballenera, que son producidas en porcentajes menores para el consumo fresco y su procesamiento industrial. Excepto Huinkul MAG, en la que se introdujo tolerancia a campo a PVY, estas variedades son susceptibles a virus y otros patógenos en mayor o menor medida (Vigliola, 1986).

2. Conservación de la biodiversidad y la variabilidad genética

La diversidad genética no se distribuye al azar en el mundo, sino que está localizada principalmente en zonas tropicales y subtropicales. En los años recientes el origen y evolución de algunas plantas cultivadas ha despertado gran interés y se han llevado a cabo nuevos estudios en plantas relacionadas analizando su distribución, comportamiento ecológico e interacción genética con las razas cultivadas (Harlan, 1992). Si bien el objetivo de esta tesis no es establecer el centro de origen de la papa cultivada, es de interés mencionar a determinados investigadores y los conceptos que los mismos expusieron.

En 1926, N. I. Vavilov, gran agrónomo ruso, quien estaba interesado en la diversidad genética y en el origen de las plantas cultivadas y sostenía que ambos estaban muy relacionados propuso en su ensayo "Sobre el origen de las plantas cultivadas", que el centro de origen de una planta cultivada se podía determinar analizando los patrones de variación; y las regiones donde existía mayor diversidad corresponderían entonces a los centros de origen del mismo. Esto es especialmente cierto si la mayor variación es controlada por genes do-

minantes y si la región también contiene razas salvajes del cultivo en cuestión. Define, según los estudios que llevó a cabo, ocho centros de diversidad. En sus leyes de series homólogas de variación expone que si en una especie cultivada se observa un patrón de variación determinado, cabe esperar que exista ese mismo patrón en otra especie relacionada a la anterior.

Desde entonces el concepto de centro de origen ha evolucionado. De este modo, Harlan, en 1971 define centros de diversidad y no centros asociados y define tres "centros primarios" de domesticación cada uno con un "no centro asociado". En el continente americano el centro sería Mesoamérica y el no centro Sud América, donde se encuentran las plantas que son analizadas en esta tesis. Posteriormente en 1983 Hawkes propone la existencia de cuatro centros básicos nucleares, en donde en forma autónoma e independiente se domestican plantas y que en las zonas de diversidad puede o no haber domesticación de las mismas.

2.1. Origen y análisis de la biodiversidad desde el punto de vista de la variabilidad genética

Dentro de una especie, las plantas individuales difieren en el ámbito de su ADN debido a mutaciones. Existen diferentes clases de mutaciones incluyendo: sustitución de bases, inserciones, inversiones y deleciones. Las sustituciones de bases pueden ser causadas por errores durante la replicación del ADN o por mutágenos ambientales (ej: radiación UV). Las inserciones/deleciones son con frecuencia causadas por trasposones, por entrecruzamientos desiguales o por deslizamientos de la ADN polimerasa durante la replicación de ADN con motivos repetitivos.

Dado que los genes comprenden una porción pequeña del ADN total y están bajo una fuerte presión de selección negativa para los cambios, la mayoría de las modificaciones perdurables que diferencian a los individuos en el ámbito de su ADN ocurren en la porción no codificante del mismo.

2.1. Conservación, evaluación y utilización de los recursos genéticos

La agricultura nacional, como en los demás países del mundo depende, en gran medida, de los recursos genéticos por lo que es fundamental preservar esos recursos para tener la mayor variabilidad genética posible, con su correspondiente caracterización y evaluación agronómica. Ello pasa a constituir un aporte invaluable para los mejoradores, y para los biotecnólogos para incrementar la cantidad y calidad de la producción de alimentos, la materia prima para la industria, el uso medicinal, etc. Es uno de los elementos centrales para contar con una producción agropecuaria competitiva y sustentable.

El país cuenta con recursos genéticos no domesticados y de razas y poblaciones domesticadas, a lo que se suman las introducidas por la inmigración Europea. Desde la década del 30 el país desarrolla la tradición de conservar sus recursos genéticos lo que se intensifica con la creación del INTA.

Más recientemente a partir de 1987 con la creación del Programa de Recursos Genéticos, que coincide con la cooperación del Instituto Agronómico de l' Oltremare (IAO), de Italia y el Programa de Fortalecimiento Institucional (con el Banco Interamericano de Desarrollo, BID) se va organizando la red nacional de germoplasma. El Banco de Base, en Castelar, y la red de Bancos Activos, en las regionales, permite a la Institución avanzar rápidamente en el tema de la Diversidad Biológica y ponerla en la tendencia de las más modernas organizaciones de conservación *ex situ* del mundo.

En este contexto el Programa del INTA apunta fundamentalmente a la conservación y evaluación agronómica de los Recursos Genéticos preparando material con variabilidad genética, de manera que sea posible su utilización inmediata por el mejorador. Las actividades de Conservación y Evaluación, son complementadas por la recolección, la caracterización botánica y la cuarentena de los Recursos Genéticos (Recursos Genéticos, <http://www.inta.gov.ar/prog-nac/pan07.htm> Internet 1998).

2.2. Importancia de la papa como recurso genético

La papa cultivada está altamente relacionada a un gran número de especies silvestres principalmente de Sud América, con las cuales es capaz de formar híbridos interespecíficos (Ross, 1986). Esta propiedad junto con las ca-

racterísticas de resistencia a enfermedades presentes en las mismas como son los casos del tizón tardío, nematodos, virosis como las producidas por PVX, PLRV, etc. (Ross, 1986), lleva a la necesidad de un estudio profundo de la variabilidad genética existente entre las especies con a) propósitos de mejoramiento y b) con fines de establecer relaciones genéticas y/o taxonómicas entre las mismas.

La conservación y uso de los recursos genéticos son esenciales para mantener y mejorar la producción agrícola. El objetivo de la conservación es preservar la mayor diversidad genética en la menor muestra posible y que incluya los genes, características y genotipos corrientemente reconocidos.

Por otro lado, la efectividad en la conservación de los recursos genéticos vegetales requiere de la aplicación de métodos complementarios para la conservación "*in situ*" y "*ex situ*" que garanticen al máximo la disponibilidad de dichos recursos para su utilización.

La necesidad de preservar a las especies cultivadas y silvestres relacionadas y también las asociadas con características de malezas ("weed") que potencialmente poseen propiedades de interés agronómico (como resistencia a patógenos, salinidad, sequía, etc.) ha cobrado gran importancia sobre todo en los últimos años debido a todos los cambios que se operan cada vez más intensamente sobre el medio ambiente. Debido a la limitación de recursos económicos para la colección y conservación adecuada de dichos individuos es necesario determinar el número y calidad de las muestras a conservar es decir, especies que tienen o tuvieron interés agrícola, malas hierbas o "weeds" que acompañan a los cultivos, especies silvestres relacionadas y potencialmente útiles para la agricultura. El desarrollo de tecnologías adecuadas para la conservación de semillas ortodoxas *ex-situ*, en bancos de germoplasma, tanto base como activos, debe ser correspondido con un adecuado avance en la evaluación mediante el empleo y desarrollo de distintas técnicas, desde morfológicas, citológicas, enzimáticas y moleculares capaces de discriminar a las distintas entidades.

3. Estudios de la variabilidad genética y sus métodos de análisis

3.1. Aspectos morfológicos y clasificación taxonómica

3.1.1. Descripción del género *Solanum*

J. G. Hawkes (gran conocedor del género *Solanum*) en el prefacio de su texto *The Potato Evolution, Biodiversity and Genetics Resources* (1990) comenta textualmente: "Mejoradores y científicos quienes trabajan en papa encontraron que la diversidad de las especies silvestres relacionadas es enigmática y frustrante. La pregunta es si son los taxónomos los que perversamente insisten en reconocer como especies a grupos muy pequeños cuando se podrían construir menos y más grandes o es que existe una dificultad intrínseca en este grupo". La respuesta que él sugiere es que "estas especies parecen ser jóvenes, activamente evolucionando con barreras imprecisas entre ellas teniendo en cuenta que las papas son el único cultivo que poseen un rango biológico tan extenso".

Solanum L. es uno de los géneros de Angiospermas con mayor número de especies (Hunziker, 1979). Las tuberosas están agrupadas en la sección *Petota* Dum (D'Arcy, 1972) y se distribuyen en 21 series taxonómicas (Hawkes, 1990), ocho de las cuales se encuentran en la Argentina (Hawkes y Hjerting, 1969; Hawkes, 1990).

Se reconocen actualmente siete especies cultivadas, con distintos niveles de ploidía incluyendo diploides, triploides, tetraploides y hexaploides.

Las especies tuberosas son intercompatibles dentro de límites muy amplios (Howard y Swaminathan, 1952; Grun, 1990). Además, los estudios citológicos revelaron escasas diferencias (Magoon *et al.* 1958). Los mecanismos de aislamiento reproductivo preponderantes son las separaciones témporo-espaciales como así también los distintos nichos ecológicos que habitan (Bates y Deyoe, 1973; Hawkes y Hjerting, 1969; Hawkes, 1990), sin embargo se demostró la existencia de barreras internas al intercambio genético en cinco especies del grupo (Sala, 1993).

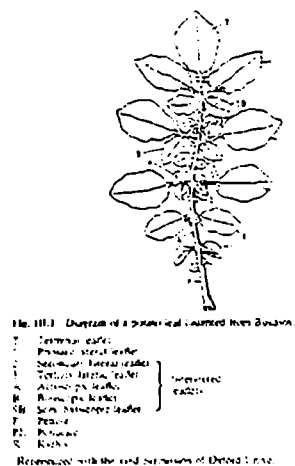
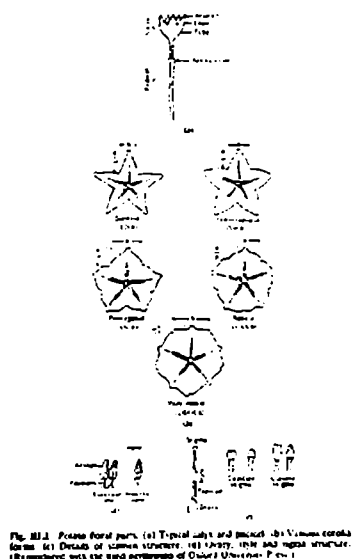
3.1.2. Clasificación taxonómica y observaciones botánicas de la sección *Petota*

Debido al gran número de especies existentes en el género *Solanum*, los taxónomos establecieron varios subgéneros, de los cuales el subgénero *Potatoe* (G. Don) D'Arcy, incluye a las papas y a otros grupos relacionados (Hawkes 1989).

El subgénero *Potatoe* ha sido posteriormente subdividido en secciones, de las cuales la sección *Petota* incluye a las especies productoras de tubérculos (antes denominada sección *Tuberarium*). Recientemente, Hawkes agregó una nueva sección denominada *Estolonifera*, que agrupa a todas las especies que nunca producen estolones o tubérculos, por lo tanto, la separación en las subsecciones se basa en la capacidad de desarrollar estolones o tubérculos.

Dentro de la subsección *Potatoe*, la morfología de la corola fue utilizada como criterio para su clasificación en superseries (*Stellata* o forma de estrella y *Rotata* forma redondeada). Para niveles inferiores de la clasificación, se consideró la forma del fruto, presencia o no de glándulas olorosas y pelos; color de las flores y morfología de las hojas (simples o compuestas), morfología de estambres y anteras, articulación del pedicelo etc. (Fig. 1).

Fig.1: Esquema de la morfología floral y de una hoja compuesta de las especies de *Solanum* analizadas en este trabajo. Las ilustraciones pertenecen a Hawkes, 1990. Se observa la articulación del pedicelo y la morfología de la corola a la izquierda y de una hoja compuesta a la derecha.



Por lo tanto se resume la clasificación en el siguiente cuadro:

Género: *Solanum* L

Subgénero: *Potatoe* (G. Don) D'Arcy

Sección *Petota* Dumortier

Subsección *Estolonifera*

Serie I *Etuberosa*

Serie II *Juglandifolia*

Subsección: *Potatoe* G. Don

Superserie: *Stellata* Hawkes

Serie I *Morelliformia* Hawkes

Serie II *Bulbocastana* (Rybd.) Hawkes

Serie III *Pinnactisecta* (Rybd) Hawkes

Serie IV *Polyadenia* Bukasov ex Correll

Serie V *Commersoniana* (Bukasov)

Serie VI *Circaeifolia* Hawkes

Serie VII *Lignicaulia* Hawkes

Serie VIII *Olmosiana* Ochoa

Serie IX *Jungasensa* Correll

Superserie: *Rotata*

Serie: X *Megistacroloba* Card et Hawkes

Serie: XI *Cuneolata* Hawkes

Serie XII *Conicibaccata* Bitter

Serie XIII *Piurana* Hawkes

Serie XIV *Ingifolia* Ochoa

Serie XV *Maglia* Bitter

Serie: XVI *Tuberosa* (Rydb.) Hawkes

Serie: XVII *Longipedicellata* Bukasov

Serie: XVIII *Acaulia* Juzepczuk

Serie: XIX *Demissa* Bukasov

3.1.2.1. Clasificación taxonómica (Hawkes, 1990; Hawkes y Jackson, 1992) de los genotipos analizados.

En la Tabla 1 se muestra la ubicación taxonómica de cada especie dentro de este género. Esta clasificación (basada en Hawkes, 1990 y en Hawkes y Jackson, 1992) es la más ampliamente aceptada en la literatura del género, aunque existen otros investigadores que agruparon a las especies según otros criterios (ver revisión de Spooner *et al*, 1997). La misma se basa principalmente en la morfología y el color de la corola, la forma de las hojas, en su EBN (relación entre la ploidía del endosperma y la del cigoto), y distribución geográfica. Con dicha clasificación, propusieron un escenario evolutivo que puede resumirse como sigue:

- 1) Las plantas de la sección *Petota* aparecen en México y América Central con especies que poseen flores pequeñas, de corolas blancas con forma de estrellas (*Stellata* primitiva) y diploides (2x) (EBN=1),
- 2) las especies migraron a Sud América en el plioceno temprano, cuando se formó el istmo de Panamá,
- 3) las especies 2x (EBN=1) evolucionaron a especies 2x (EBN=2) con corolas blancas pero con forma de estrella menos aguda (*Stellata* avanzada),
- 4) las *Stellata* avanzadas evolucionaron hacia 2x (EBN=2), 4x (EBN=4) y 6x (EBN=4) con corolas más redondeadas (*Rotata* primitiva),
- 5) las *Rotata* primitivas y con varios niveles de ploidía evolucionaron a 2x (EBN=2), 4x (EBN=2) y 6x (EBN=4), quedando muy pocas con 2x (EBN=1) y corolas muy redondeadas (*Rotata* avanzada).

Tabla 1. Taxonomía del material evaluado. Se describe la morfología de la corola, carácter utilizado por estos autores para la división en superseries, considerando al estado "corola en forma de estrella (*Stellata*)" como su forma primitiva y "corola en forma redondeada (*Rotata*)" como más evolucionada. (S, *Stellata*; SP, primitiva *Stellata*, R, *Rotata*, RP, *Rotata* primitiva, RA, *Rotata* avanzada).

Género: *Solanum*

Subgénero: *Potateo*

Subsección: *Potateo*

Superserie: *Stellata*

Serie *Commersoniana* (SP)

Serie *Jungasensa* (SA)

S. commersonii

S. chacoense

S. tarijense

Superserie: *Rotata*

Serie: *Megistacroloba* (RP)

Serie: *Cuneolata* (RP)

Serie: *Tuberosa* 1 (RP)

Serie: *Tuberosa* 3 (RP)

S. megistacrolobum

S. infundibulliforme

S. verrucosum

S. gourlayi

S. kurtzianum

S. microdontum

S. oplocense

S. spegazzinii

S. vermei

S. venturii

Serie: *Acaulia* (RA)

Serie: *Tuberosa* cultivada (R)

S. acaule

S. tuberosum

Los estudios de ADN de cloroplastos (Hosaka, 1984; Spooner y Sytsma 1992; Spooner *et al*, 1997) apoyan parcialmente la clasificación de las Superseries y sus hipótesis evolutivas. En el género *Lycopersicon* los estudios de ADN genómico mediante RFLP (Miller y Tanksley, 1990), permitieron calcular las

distancias genéticas, y destacaron que los datos basados en estudios de ADN de cloroplastos y mitocondriales, mostraron resultados anómalos. Los análisis de los ADN de cloroplastos realizados por Hosaka (1986) permitieron agrupar a las especies en 5 tipos de ADN cloroplastídicos. La mayoría de las especies que se estudiaron fueron agrupadas en el tipo W de cp ADN, con la excepción de *S. acaule*, *S. tuberosum* (incluyendo sus dos subespecies) y *S. tarijense*, siendo por lo tanto esta estrategia poco útil para la separación de estos taxones (evidenciando el alto grado de conservación del ADN de esta organela dentro del género). En especies de *Solanum*, algunos trabajos basados en el análisis de ADN genómicos también sugieren algunas discrepancias con la clasificación derivada de los resultados de plástidos así como con la clasificación del género (Debener *et al*, 1991). Este trabajo aporta datos, además, sobre la alta variabilidad intraespecífica existente en el grupo, que también es motivo de análisis de esta tesis. Por lo tanto y en términos generales, el trabajo de Spooner *et al* (1997) que involucró un gran ensayo de individuos de la Sección *Petota*, mediante ADN de los plástidos, no aportó evidencias sobre la evolución de los taxones estudiados en nuestro trabajo, sugiriendo que resulta más adecuado concentrarse en el estudio de variabilidad intra e inter específica de marcadores que involucren el ADN genómico nuclear cuando el objetivo es contribuir al conocimiento evolutivo del grupo.

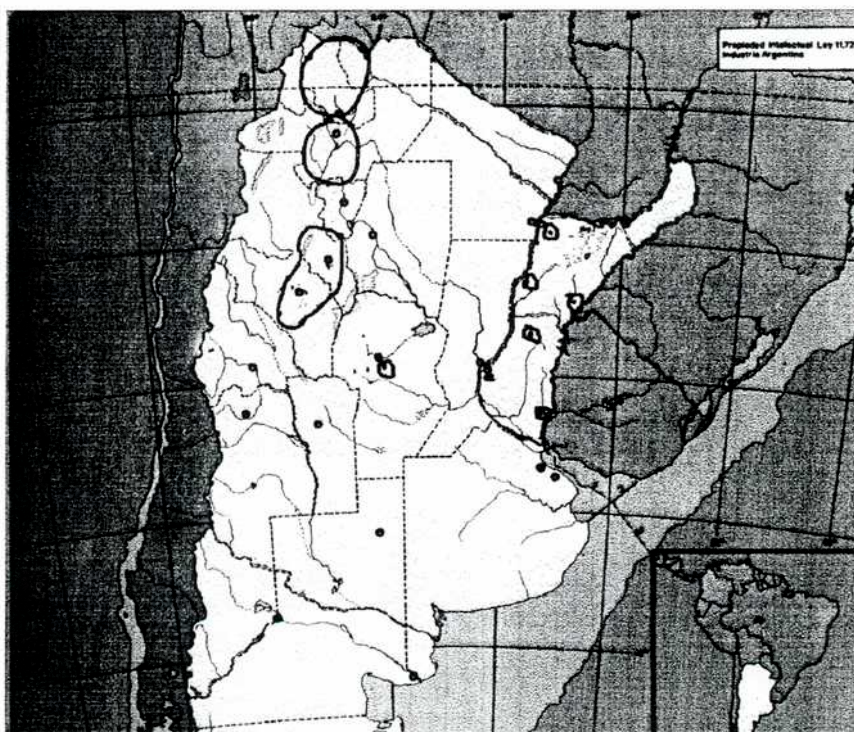
3.1.3. Distribución geográfica y centros de diversidad

La diversidad genética no se distribuye al azar en el mundo, sino que está localizada principalmente en zonas tropicales y subtropicales. En los años recientes el origen y evolución de algunas plantas cultivadas ha despertado gran interés y se han llevado a cabo nuevos estudios en plantas relacionadas analizando su distribución, comportamiento ecológico e interacción genética con las razas cultivadas (Harlan, 1992).

Las especies silvestres de *Solanum* están ampliamente distribuidas a lo largo de América, desde el SO de EUA, en casi todos los estados de México y desde allí hasta Guatemala, Honduras, Costa Rica y Panamá. En América del Sur, se las encuentra en todos los países, excepto en las Guayanas; funda-

mentalmente en los Andes de Venezuela, Colombia, Ecuador, Perú, Bolivia y Argentina. También se distribuyen en la costa desértica peruana, centro y sur de Chile, en los llanos de Argentina, Paraguay y Uruguay y también en el SE de Brasil. Claramente se distinguen dos centros de diversidad: uno es el de México central y el otro en los Andes desde Perú, Bolivia y NO de Argentina (ver Fig.2) (Hawkes, 1990). Esta amplia distribución indica una gran adaptación a distintos nichos ecológicos tanto naturales como modificados por el hombre (llegando a altitudes de 3.500 a 4.500 m o más).

Fig. 2: Distribución geográfica de las especies silvestres de papa analizadas. Las procedencias de los genotipos se indican con bordes negros.



3.2. Citogenética comparativa

3.2.1. Recuentos cromosómicos y cariotípicos

Los estudios cromosómicos en general y citogenéticos en particular están basados en características visibles de los cromosomas mediante microscopio.

pía. El análisis de los cariotipos, un método muy utilizado, está sustentado en las características morfológicas de los cromosomas y se usa ampliamente en análisis citológicos.

Entre las características de los cariotipos, la longitud relativa (LR) y la razón de brazos (RB) de un cromosoma constituyen parámetros representativos del cariotipo junto con otras características morfológicas como presencia de satélites, posición de las constricciones secundarias y terciarias, etc. En particular, la razón de brazos ha sido utilizada para la clasificación de los tipos de cromosomas (Levan *et al*, 1974), y considerada como el parámetro más estable de la morfología cromosómica.

El estudio de los cariotipos de células somáticas permite el análisis y comparación de los genomas entre y dentro de especies. Los cariotipos son representativos de varias características de los genomas específicos; el número y longitud de los cromosomas que lo constituyen son indicativos del tamaño de los mismos, de eventos de amplificación diferencial de secuencias repetitivas específicas (transposiciones y retroposiciones) y de rearrreglos de los grupos de ligamiento. Estos estudios ofrecen la posibilidad de obtener información acerca de la evolución del número básico de un grupo y mecanismos de evolución del genoma (Swanson *et al.*, 1981 citado en Wilkinson, 1994).

A pesar de la importancia económica que poseen las especies silvestres relacionadas con el género *Solanum* como reservorio de genes, se cuenta con poca información acerca de la morfología cromosómica de las mismas. La mayoría de los estudios de esta naturaleza se llevaron a cabo apenas en *S. tuberosum* y *S. phureja*. Esto se debe al escaso tamaño de los cromosomas y a la frecuente poliploidía (Hawkes, 1979; Pijnacker y Ferwerda, 1984). Además existen dificultades técnicas como, por ejemplo, la obtención de ápices radiculares con activas divisiones mitóticas, obstáculo que fue superado gracias a la utilización del cultivo *in vitro* y micropropagación de entrenudos (ver Materiales y Métodos).

Los primeros análisis citológicos de *S. tuberosum* describiendo el número cromosómico somático de $2n=48$ datan de la década del 20. En 1927 se describen los números gaméticos de $n=12$ para especies silvestres relacionadas como *S. chacoense* y por primera vez se observa la existencia de $n=36$ para *S. demissum* evidenciando de esta manera la existencia de poliploides en

la sección (Wilkinson, 1994). Se propuso entonces un número básico de $x=6$ para este grupo lo cual fue muy discutido y en su lugar fue sugerido $x=12$. Swaminathan y Howard (1953, citado por Wilkinson, 1994) señalaron que este número está extremadamente conservado en la tribu *Solanaceae* y es más razonable suponer que este número básico se haya establecido tempranamente en la evolución de la tribu.

En 1975 se llevaron a cabo estudios meióticos en papas monoploides que sugieren la presencia de secuencias duplicadas, debido a la formación de bivalentes Van Breukelen *et al.* (1975 citado en Wilkinson, 1994), lo cual se confirmó por estudios con alozimas.

La identificación de los cromosomas de *S. tuberosum* está basada fundamentalmente en análisis de paquitenes (Yeh y Peloquin, 1965; Ramana y Wagenvoort, 1976) lo que implica un método laborioso y que depende del desarrollo de flores, no muy comunes en algunas papas (Stack, 1982; citado en Pijnacker y Ferwerda, 1984).

Tratando de identificar a los cromosomas de papa, numerosos autores ensayaron diferentes técnicas en distintos tejidos. En 1974, Mok (citado en Wilkinson, 1994) fue el primero que desarrolló bandeó C Giemsa en cromosomas de papa. Posteriormente, Pijnacker y Ferwerda (1984) mejoraron la resolución técnica y clasificaron a los cromosomas de un monoploide de *S. tuberosum* según su tamaño y posición del centrómero utilizando células somáticas (fundamentalmente ápices radiculares).

En el presente trabajo se evaluaron el número y la morfología cromosómica del grupo de especies estudiadas.

3.2.2. Contenido de ADN

El análisis del contenido de ADN de diferentes especies ha sido útil para estudios citotaxonómicos y evolutivos. El valor C es de fundamental significación debido a los efectos nucleotípicos, como por ejemplo todos los efectos fenotípicos debidos a la masa nuclear de ADN independientemente de la información codificada.

La estimación del contenido de ADN nuclear por medio de microdensitometría ha proporcionado en este sentido datos de gran utilidad para el conocimiento del núcleo en plantas superiores (Bennet *et al.*, 1982). En general el contenido de ADN es específico y único para cada especie taxonómica, aunque se ha encontrado variabilidad intraespecífica con mayor frecuencia de lo esperado.

Desde que fue posible la cuantificación de ADN de numerosas especies, estos datos se trataron de asociar con distintos tipos de características: duración de la división celular y meiosis, poliploidía, ciclo de vida, distribución geográfica, forma de cultivo (anual o perenne), longitud y/o volumen del complemento cromosómico, relaciones filogenéticas, etc.

También los contenidos de ADN han sido de gran interés para ser utilizados en el control de la variabilidad (variación somaclonal) de plantas cultivadas "*in vitro*", como regenerantes de callos, plantas micropropagadas, etc. (Jacobsen *et al.*, 1983; Pijnacker *et al.*, 1986).

Desde el punto de vista de la poliploidización como mecanismo evolutivo, este fenómeno se ve reflejado en el 26% de las 183 especies de la sección (un 74% son diploides y sólo hay un 15% de tetraploides, 4% de triploides, 5% de hexaploides y 2% de pentaploides) y, taxonómicamente hablando, de las 21 series, 6 son poliploides (Hawkes, 1990). Por medio del estudio de ADN total puede evaluarse el efecto de la poliploidización en cuanto a conservación o pérdida importante del ADN durante dicho proceso.

En cuanto a su aplicación práctica, el contenido de ADN se utiliza para el cálculo del número total de bases nucleotídicas aproximadas de un genoma y así poder deducir, por ejemplo, a cuántas pares de bases nucleotídicas equivalen las unidades de recombinación (para poder correlacionar mapas físicos con mapas genéticos) y así calcular la distancia física de un marcador molecular asociado a un gen de interés y estimar su factibilidad de clonado. Este conocimiento también es importante para la cuantificación del número de copias de genes codificadas en un determinado genoma (por ejemplo, en experimentos de comparación de hibridación relativa de Southern) y técnicamente para establecer la cantidad de ADN necesario para la aplicación de distintas técnicas moleculares como PCR; RFLP, AFLP, microsatelites, etc. con el objeto de conocer el número de copias del genoma que se están analizando. Dado que,

en nuestro conocimiento, no hay publicaciones hasta el momento detallando el contenido de ADN de la mayoría de las especies aquí evaluadas, una de las razones por las que se analizaron (en esta tesis) los contenidos de ADN mediante microdensitometría (además de su uso para comparaciones evolutivas) fue considerado su uso como requisito previo y necesario para la aplicación de las modernas técnicas de la genética molecular (por ejemplo, los marcadores moleculares).

3.3. Comparación de los patrones de variación de las unidades de repetición de los genes ribosomales

La variabilidad (o conservación) de las unidades de repetición conteniendo los cistrones ribosomales fue ampliamente descrita para numerosas especies y en base a estos datos se llevaron a cabo distintos tipos de estudios (caracterización, diversidad genética, taxonomía, evolución etc.) tanto en animales como en vegetales (Hillis and Dixon (1991). En este trabajo, se analiza la factibilidad de emplear este tipo de análisis para el estudio genético-evolutivo de este grupo de especies en particular.

Al igual que lo que sucede en tomate (ver Vallejos *et al.*, 1986), la posición física de la familia multigénica que codifica para los ARNs ribosomales de 25, 5,8 y 18S de la papa ha sido localizada en el cromosoma 2 y coinciden con el NOR de dicho cromosoma (Visser *et al.*, 1988; también confirmado por Bonierbale *et al.*, 1988 mediante mapeo de RFLP).

Estos genes están presentes en múltiples copias (desde 5-10 en bacterias hasta varios miles en eucariontes) y en estos últimos están organizados en repeticiones en tándem donde cada copia (o unidad de repetición) consta de un espaciador intergénico, del gen que codifica para la subunidad de 18S, de un espaciador intragénico, que incluye el gen codificante de la subunidad 5,8S y de la secuencia que codifica para la subunidad del 25S (Crouch y Bachellerie, 1986; Delseny *et al.*, 1990).

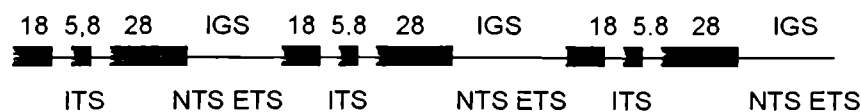
Esta familia de secuencias presenta la ventaja de que el alto número de copias por genoma facilita su detección pero, fundamentalmente, de que la unidad transcripcional presenta diferentes niveles de variabilidad que en princi-

pio permitirían el estudio evolutivo entre distintos organismos pertenecientes a diferentes niveles taxonómicos.

En el esquema (Fig. 3) se detalla el orden de los genes que codifican para las subunidades 25S, 5.8S y 18S, como así también los espaciadores intra e intergénicos.

Cada uno de estos fragmentos posee una tasa de fijación de mutaciones diferencial, siendo los fragmentos **más variables** los que corresponden al espaciador intergénico denominado IGS (entre y dentro de especies de un género, ver revisión de Rogers *et al.*, 1987). Este a su vez abarca dos regiones: una región de mayor variabilidad aún, denominada NTS (espaciador no transcripto) y ETS (espaciador externo transcripto, ver Hillis y Dixon, 1991). Los segmentos de **variabilidad intermedia** son los correspondientes al Espaciador Intragénico (ITS) transcripto cuya secuencia se ha utilizado, por ejemplo, para analizar la filogenia de organismos muy diversos; entre ellos, hongos como *Fusarium* y *Rhizoctonia* (White *et al.*, 1990; Schneider *et al.*, 1997), árboles como *Eucalyptus* (Rodríguez, L. comunicación personal), *Oxalis* (Tosto *et al.*, 1997), etc. Finalmente los genes propiamente dichos (18S y 25S) están **altamente conservados**, sobre todo el 18S que se utilizó para filogenia entre *phyla* de eucariotes (Hillis y Dixon, 1991). Como antecedente específico de interés para esta tesis, Borisjuc *et al.* (1993) demostraron, por secuenciación nucleotídica, que la zona correspondiente a 125 bases próximas al extremo 3' del gen que codifica para el ARN ribosomal 25S muestra variabilidad entre distintos géneros de la familia *Solanaceae*.

Fig.3: Esquema de la subunidad repetitiva del rADN de plantas.



En papa, los primeros estudios moleculares de estos genes se publicaron a partir de 1991 tanto por Gruber como por Harding. Posteriormente (1993) el grupo liderado por Hemleben extendió sus análisis a otras especies del género *Solanum* altamente relacionadas a la papa. En estos trabajos se establecieron mapas genéticos (mediante el análisis de dihaploides) para las variantes

alélicas provenientes de dos genotipos de papas cultivadas y evidenciadas con las enzimas de restricción *Bgl*II y *Xba*I (Gruber, 1991). Se observaron variaciones tanto en los tamaños como en la distribución de sitios de restricción de las subunidades y se postuló la existencia de al menos 5 tipos distintos, evidenciando gran variabilidad dentro de uno de los cultivares (cv. Sirtema). Para determinar el tipo de rearrreglo de dichas subunidades, estos investigadores clonaron 3 fragmentos de ADN producto de digestión parcial con la enzima de restricción *Xba*I (entre 30 y 50 kb) en cósmidos y encontraron que sólo uno de los tres mostró uniformidad en las subunidades involucradas. Los otros dos restantes evidenciaron en cambio, la presencia de patrones correspondientes a distintas subunidades. Sugirieron, entonces, que la heterogeneidad encontrada se podía atribuir a uno solo de los cromosomas II del parental tetraploide del cultivar estudiado (debido al patrón de segregación de los dihaploides, aunque sólo un número escaso de ellos (6) han sido analizados). Esto pone de manifiesto que el sistema no es muy simple y requiere de un cuidadoso análisis.

Harding (1991) analizó la estabilidad de los genes ribosomales en plantas conservadas por crioconservación (técnica que somete a las mismas a distintos tipos de estreses) y para ello estudió la variabilidad del fragmento que involucra fundamentalmente al IGS en dos cultivares (Golden Wonder y Désirée) comparando plantas control y criopreservadas, sin detectar cambios cualitativos entre los dos grupos.

En 1993, el grupo de Hemleben puntualizó los siguientes aspectos para un grupo de especies del género *Solanum*:

- que los tamaños de las subunidades de las especies analizadas del género *Solanum* oscilan, en general, entre 8,7 y 9,3 kpb y que los sitios *EcoRV*, *Xba*I, *Dra*I y *EcoRI* correspondientes a las zonas codificantes del 18S, 5,8S y 25S estaban altamente conservados,
- que existe mayor homogeneidad de longitudes de rDNA en este género en comparación con otras *Solanaceae* (*Nicotiana*, por ejemplo, muestra una variabilidad mucho mayor, que va de 9,5 a 13 kpb),
- la presencia de un sitio *Xba*I (en el espaciador externo) que está solamente en *Solanaceas* no tuberosas y en las tuberosas primitivas,
- la especificidad de un sitio *EcoRI* en el espaciador intergénico para *Solanum* y *Lycopersicon esculentum*.

Cabe destacar sin embargo que todos estos datos fueron obtenidos evaluando solamente una entrada por especie perdiéndose, por lo tanto, la noción de la variabilidad intraespecífica.

En el presente trabajo se analizaron varias entradas por especie y se hallaron algunas discrepancias con los datos presentados por otros autores recién mencionados. Además se identificaron nuevos sitios de restricción en algunas especies, como así también pérdida de alguno de ellos en otras.

3.4. Marcadores genéticos

Los progresos en el mejoramiento de plantas dependen de la variabilidad genética disponible. Para poder mantener y utilizar efectivamente las colecciones de germoplasma, es importante lograr medir el nivel de mutaciones nuevas presentes en los diferentes ejemplares que comprende la colección. Los marcadores genéticos permiten obtener una medida cuantitativa de la variabilidad genética de una colección de germoplasma. Con esta información (así como información agronómica e histórica) es posible:

- 1) Identificar material duplicado en la colección,
- 2) Establecer una colección de referencia (también llamada "core collection"),
- 3) Determinar los grados de similitud entre especies cultivadas y salvajes,
- 4) Establecer prioridades para la adición de material nuevo a una colección.

Un marcador genético ideal debe cumplir con los siguientes requisitos:

- 1) ser polimórfico, de ser posible altamente polimórfico y multialélico
- 2) ser de alta heredabilidad, o sea, altamente reproducible en la progenie
- 3) presentar segregación mendeliana y comportamiento co-dominante, esto es, la factibilidad de identificar las tres clases alélicas (AA, Aa y aa)
- 4) ser abundantes y dispersos por todo el genoma
- 5) ser fenotípicamente neutros y
- 6) ser detectables en cualquier momento del desarrollo del individuo (Tansley *et al.*, 1989; Paterson *et al.*, 1991; Bretting y Widrechner, 1995).

Existen tres tipos de marcadores genéticos: morfológicos, bioquímicos (o proteicos) y moleculares. Todos los marcadores detectan variaciones en el ADN, sin embargo lo hacen a niveles diferentes. Los morfológicos evalúan el efecto final de un gen a través de un fenotipo (una coloración o morfología distintiva). Los marcadores proteicos (considerados por algunos autores dentro de los marcadores moleculares), se centran en polimorfismos (de tamaño o carga) del producto de traducción del gen y los marcadores moleculares detectan variaciones directamente sobre el ADN.

3.4.1. Marcadores morfológicos

La idea de utilizar métodos genéticos para inferir la presencia o ausencia de un gen o grupo de genes no es nueva. Sax (1923) fue el primero en sugerir la utilización de patrones de pigmentación de la semilla del poroto como marcadores de su tamaño.

Los marcadores morfológicos presentan la desventaja de ser muy escasos y de causar cambios fenotípicos notables, no siempre deseados (Tanskley, 1983). Su gran utilidad, sin embargo, consiste en la simpleza de su evaluación. Como ejemplo en papa se pueden mencionar al *locus F* (color de la flor), *h* (ausencia de pelos), *Mi* (resistencia a nematode de la raíz), *Wx* (*waxy*) y *PSC* (color púrpura de la piel de la papa) entre 66 marcadores morfológicos ubicados en el mapa de papa (Pillen *et al*, 1996).

3.4.2. Marcadores proteicos

El descubrimiento de variantes alélicas de proteínas de reserva y de enzimas de igual función bioquímica, pero de distinta composición molecular (llamadas isoenzimas o más correctamente, alozimas) proveyó un tipo de marcador genético molecular sin los efectos epistáticos mencionados de los marcadores morfológicos (Markert y Moller, 1959). El polimorfismo en las isoenzimas está dado por un cambio en el punto isoeléctrico de las mismas causado por cambios en su composición aminoacídica y que se revela después de su fraccionamiento en geles de almidón (poliacrilamida o acetato de celulosa) en

presencia de sustratos específicos cuyos productos de reacción pueden ser coloreados (Tanskley, 1983), mientras que las proteínas de reserva presentan un polimorfismo en su peso molecular relativo (M_r) que se revela por separación electroforética en geles de poliacrilamida y tinción total de proteínas. Tanto las isoenzimas como las proteínas de reserva han sido utilizadas para identificación varietal y estudios evolutivos (Gepts, 1990; Wendel y Weeden, 1989) en los últimos 25 o 30 años en cereales, mientras que en *Solanaceas* se mapearon aproximadamente 30 isoenzimas en el mapa comparativo de papa y tomate (Pillen *et al.*, 1996) y se localizó entre 10 y 15 copias (*loci*) de los genes responsables de las proteínas de reserva más abundante en papa llamada patatina (Ganal *et al.*, 1991).

Las alozimas son altamente heredables y presentan un nivel aceptable de polimorfismo en germoplasma silvestre (Martinez Zapater *et al.*, Oliver *et al.*, Quiros *et al.*, constituyendo, quizás, el tipo de marcador más utilizado en manejo de germoplasma (Simpson y Withers, 1986). Existen además ejemplos de isoenzimas ligadas a resistencia a enfermedades en *Aegilops* (McMillin *et al.*, 1986), a nematodos y a caracteres cuantitativos en tomate (en Pillen *et al.*, 1996; Tanskley *et al.*, 1982).

3.4.3. Marcadores moleculares

Los marcadores a nivel de ADN son quizás los que más se acercan a la descripción ideal de un marcador genético. La secuencia de ADN de los organismos sufre a lo largo de su evolución un gran número de mutaciones puntuales, deleciones y/o rearrreglos de fragmentos cromosómicos. Dada la dispersión y dilución de secuencias codificantes en el genoma de los organismos superiores y a la falta de presión de selección negativa, la mayoría de estos cambios se acumulan en las regiones no codificantes. Es interesante remarcar que el ADN tanto de plantas como de animales presenta una gran cantidad de secuencias no codificantes, llamada por algunos autores ADN "basura" (Ohno, 1972) por no poseer función conocida. Sin embargo, desde el punto de vista de los marcadores genéticos este ADN es de suma utilidad. Esto se debe a que los cambios ocurridos en el transcurso de la evolución, en secuencias codificantes están sujetos a presión de selección. Un cambio nucleotídico que pro-

voque la aparición de un codón de terminación en una proteína vital para la supervivencia de un organismo, el cambio en secuencias reguladoras de genes importantes y hasta la inclusión de una mutación silenciosa pero que no esté en coincidencia con el uso de codones de un organismo puede tener efectos letales o deletéreos y habrá de ser seleccionado en contra. Esto lleva a una acumulación de variantes a nivel ADN que por ser selectivamente neutras, han ido acumulándose estocásticamente en las regiones no codificantes de los organismos superiores. Los marcadores a nivel ADN tratan de explotar esa variabilidad de diferentes maneras.

Existen dos maneras básicas de revelar polimorfismos entre genotipos:

- i) mediante el corte de ADN con enzimas de restricción.
- ii) mediante amplificación de ADN.

Diferentes técnicas utilizan uno u otro método y algunas más novedosas que utilizan ambos.

Los polimorfismos de longitud en fragmentos de restricción (RFLP) y los polimorfismos de longitud de fragmentos amplificados (AFLP) se ubican dentro del primer grupo. La capacidad de cada tipo de marcador para detectar variaciones en el ámbito de la secuencia del ADN varía de acuerdo a características inherentes a los métodos usados para detectar cada uno de ellos.

3.4.3.1. RFLP

Los polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) se basan en separar mediante electroforesis los fragmentos de ADN obtenidos por digestión con una enzima de restricción, y detectar mediante hibridación con fragmentos de ADN marcados (sondas), correspondientes a secuencias únicas o de bajo número de copias (Tanskley *et al.*, 1989), que determinará la generación de un patrón simple de hibridación. Un RFLP ocurrirá cuando existan variaciones en la secuencia de ADN que involucren cambios en la distancia entre sitios de corte de la enzima, en fragmentos que incluyan la secuencia correspondiente a la sonda utilizada (Fig. 4). Los RFLP detectan tanto mutaciones puntuales que afecten sitios de restricción, como rearrreglos cromosómicos (inversiones, deleciones e inserciones) en la vecindad de sitios de corte, siendo

éstos últimos las causas más frecuentes de polimorfismos en vegetales superiores.

Los RFLP son alta y establemente heredables, de efecto fenotípico neutro, no influenciados ambientalmente, de segregación mendeliana, multialélicos y fueron los primeros marcadores que se desarrollaron con posibilidad de saturar un mapa (De Verna y Alpert, 1990). Si bien esto es teóricamente irrefutable, en la práctica existen dos limitaciones: el número de sondas desarrolladas y el escaso grado de polimorfismo encontrado en ciertos organismos.

El desarrollo de sondas para RFLP incluye el aislamiento, clonado y selección de fragmentos de ADN y requiere una extensiva evaluación para identificar secuencias de bajo número de copias (o ADN de secuencia única).

Existen evidencias de bajo nivel de polimorfismos en tomate (Helentjaris *et al.*, 1985), soja (Keim *et al.*, 1992) y trigo (Liu *et al.*, 1990).

Otra desventaja inherente a los RFLP es que son técnicamente complejos (requieren cierta infraestructura), de alto costo e involucran mucho trabajo. Además, la cantidad de ADN necesario (un mínimo de 10 µg por genotipo por carril electroforético) hace impracticable detectar RFLP para un gran número de sondas partiendo de plántulas.

En resumen:

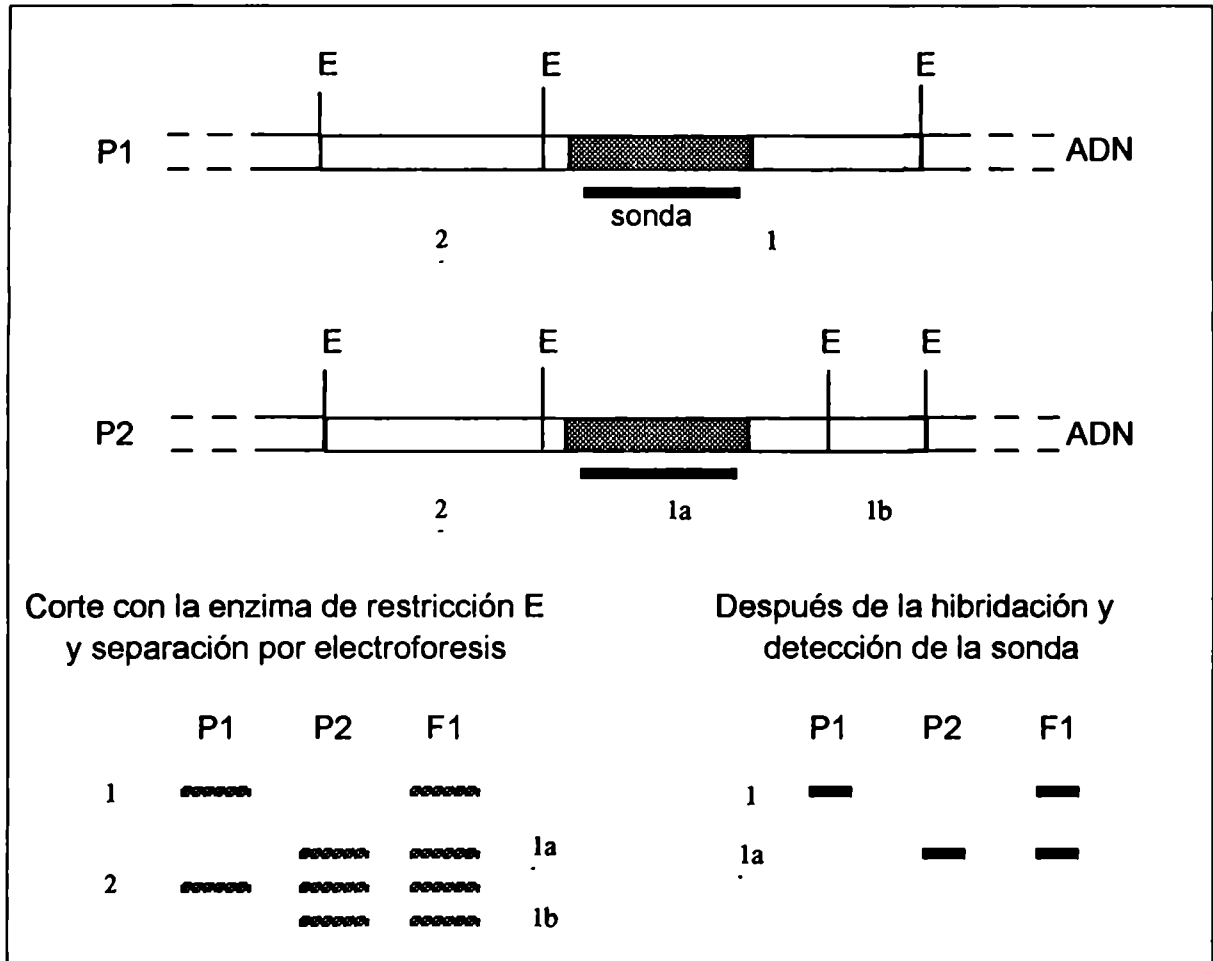
Las ventajas son:

1. Es una técnica de visualización co-dominante (permite observar 2 alelos en el heterocigota) y multialélica mostrando una alta información polimórfica, según el grupo de análisis.
2. Son altamente repetibles y las sondas son en la mayoría de los casos de carácter público.
3. Sirven para establecer mapas comparativos entre distintas especies y aún entre distintos géneros (sintenia).
4. Son puntos de anclaje de otros marcadores en mapas de ligamiento.

Las desventajas son:

1. El desarrollo de las genotecas es laborioso y costoso, al igual que la selección de los clones para secuencias de bajo número de copias.
2. Se requiere la utilización de mucha cantidad de ADN de gran pureza
3. La aplicación es muy laboriosa y costosa.

Fig. 4: Detección de polimorfismos en fragmentos de restricción



██████████ región complementaria a la sonda
 E sitio de corte de la enzima de restricción E
 P1: genotipo 1, locus homocigota patrón 1
 P2: genotipo 2, locus homocigota patrón 2
 F1: locus heterocigota patrón 1 y 2.

En el segundo grupo de marcadores, aquellos que utilizan la amplificación de ADN como método para detectar variabilidad, están incluidos, entre otros, los RAPD (ADN polimórfico amplificado al azar), y los microsatélites o SSR (repeticiones de secuencia simple).

3.4.3.2. RAPD

Los RAPD son productos de amplificación cuyo único proceso azaroso consiste en la elección del iniciador o "primer" (oligonucleótido sintético, ~10

nt) de secuencia arbitraria, que se utiliza en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Williams *et al.*, 1990; Welsh *et al.*, 1990; Hadrys *et al.*, 1992; Lynch *et al.*, 1994).

Estos productos se generan por la existencia de secuencias complementarias al "primer" en una cadena y la reversa de la complementaria en la otra cadena a una distancia no mayor de 2 ó 3 kb. Los fragmentos amplificados son posteriormente separados mediante electroforesis y visualizados en tinciones con bromuro de etidio. Los polimorfismos en RAPD, son en general, de tipo dominante (presencia vs. ausencia) y se producen cuando el arreglo espacial de secuencias enunciado no se produce, ya sea por falta de alguna de las secuencias complementarias al "primer" o por una excesiva distancia entre las mismas. Resumiendo

Las ventajas de los RAPD son:

- Los ensayos requieren una muy pequeña cantidad de ADN
- Suelen ser eficientes en la detección de polimorfismos
- No requieren una tecnología sofisticada para su realización

Las desventajas son:

- Son marcadores de visualización dominante (como se mencionó anteriormente).
- La información de un *locus* no puede ser siempre extrapolada entre especies. Es decir, a medida que aumenta la distancia genética aumenta la probabilidad de que 2 bandas que comigren pertenezcan a 2 *loci* diferentes.
- No son altamente reproducibles entre distintos laboratorios.

3.4.3.3. Microsatélites o SSR

El origen del término microsatélite proviene de los estudios iniciales de sedimentación del ADN en gradientes de cloruro de cesio, donde se visualizaba una banda definida de ADN y otra banda extra de densidad diferente. Esto era causado por regiones con un porcentaje de GC (GC%) distinto a la media del organismo estudiado. Regiones con mayor GC% presentan mayor densidad dada por la mayor compactación del ADN ya que estos pares están unidos por tres puentes hidrógeno mientras que los pares AT sólo por dos. Estudios poste-

rios revelaron que estas bandas extras o satélites estaban conformadas por secuencias de ADN repetitivo localizadas en la mayoría de los casos en regiones centroméricas o heterocromáticas (Pardue y Gall, 1970).

La técnica de huellas dactilares de ADN (DNA fingerprinting) desarrollada por Jeffreys y colaboradores, consiste en secuencias de alrededor de 50 pares de bases (pb) de longitud, repetidas en tándem de número de copias variables (también denominadas VNTR). Debido a su carácter repetitivo pero de motivos de longitud pequeña, Jeffreys (1985) se refiere a ellas como mini-satélites por homología con al ADN repetitivo de los experimentos de sedimentación.

El término de microsatélites fue introducido por Litt y Luty (1989) para describir repeticiones cuyos motivos van de 1 a 6 pb.

Los microsatélites (también denominados repeticiones de secuencia simple, SSR) fueron identificados primeramente en humanos (Miesfeld *et al.*, 1981) y se evidenció la presencia de distintos motivos a través de búsquedas en base de datos genéticos (i.e. EMBL y GenBank) (Tautz *et al.*, 1989). Estos estudios revelaron que la presencia de motivos de di y trinucleótidos era de 5 a 10 veces más abundante de lo que se esperaría en una distribución arbitraria. En animales la secuencia más abundante es (AC)_n mientras que en vegetales lo es (AT)_n, y en menor medida (AG)_n. Se propuso que la diferencia encontrada en distintos individuos en el número de repeticiones del motivo central era debido a entrecruzamiento desigual y/o a deslizamientos de la polimerasa durante la replicación del ADN, junto con una deficiencia en la corrección de errores, dada la naturaleza repetitiva del segmento (Tautz *et al.*, 1989). La hipervariabilidad encontrada junto con la alta presencia de microsatélites llevó a que se propusiera su uso como marcadores moleculares (Beckman y Soller, 1990; Morgante y Olivieri, 1993).

Los polimorfismos son detectados a través de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando "primers" complementarios a regiones únicas que flanquean a los microsatélites (Brown *et al.*, 1996). Estos productos son luego separados por electroforesis en agarosa o en poliacrilamida y teñidos con bromuro de etidio en el primer caso y radioactivamente o con plata en el segundo.

La ventaja que ofrecen estos marcadores es que a partir del uso de la PCR son técnicamente simples, económicos y automatizables. Además utilizan muy poca cantidad de ADN, lo que permite múltiples determinaciones aún partiendo de una pequeña porción de tejido.

La mayor desventaja que presentan los microsatélites es el alto costo que implica su desarrollo inicial (obtención de las secuencias flanqueantes necesarias para el diseño de "primers"). Brown *et al.*, (1996) han propuesto tres alternativas de desarrollo de SSR. Las dos primeras consisten en buscar en bancos de datos secuencias de la especie en estudio o de especies relacionadas, en caso de no existir suficiente información de las primeras. La tercera alternativa es la construcción de una genoteca para identificar clones que contengan SSR.

La disponibilidad actual de secuencias en base de datos es aún limitada, inclusive incluyendo en la búsqueda especies afines a la de estudio. Además, en su gran mayoría los bancos de datos presentan, fundamentalmente, secuencias codificantes correspondientes a genes. Asimismo, el nivel de variación que es posible encontrar puede estar limitado por un proceso de selección en contra de las mutaciones que afecten adaptativamente a los individuos. Existen evidencias en humanos de enfermedades relacionadas a variaciones en la longitud de microsatélites (en general trinucleótidos) como el síndrome de fragilidad del cromosoma X (Kremer *et al.* 1991) o la distrofia miotónica muscular (Fu *et al.*, 1992).

Por lo tanto, si bien los bancos de datos de secuencia pueden constituir una aproximación a la obtención de microsatélites, la tercera alternativa parece la más razonable para la obtención de un gran número de marcadores con alta variabilidad. Recientemente, han sido propuestos distintos métodos de construcción de bibliotecas genómicas de tal manera que resultan enriquecidas en secuencias que contienen microsatélites (Karagoyozov *et al.*, 1993; Kandpal *et al.*, 1994; Prochazka, 1996; Edwards *et al.*, 1997). La descripción alélica a partir del número de pares de bases nucleotídicas del fragmento amplificado es precisa, fácil de comunicar y sencilla de estandarizar entre diferentes laboratorios.

Los altos valores de PIC (información de contenido polimórfico) encontrados indican que son los marcadores con mayor poder de discriminación conocidos hasta ahora, comparados tanto con otros marcadores más tradiciona-

les (como los RFLP o las isoenzimas), como con otros marcadores más novedosos (como los AFLP o los RAPD), especialmente entre variedades de especies autóгамas con bajos niveles de variabilidad genética. En resumen:

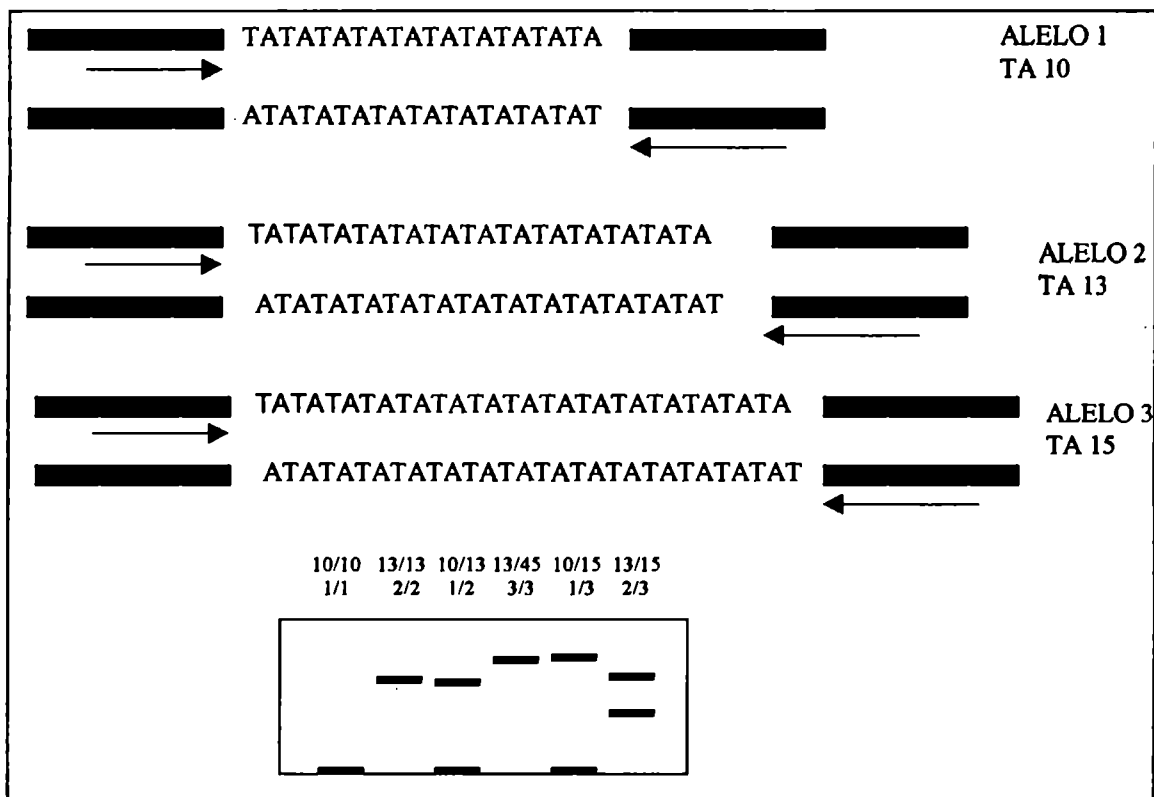
Las ventajas son:

- Es una técnica de visualización co-dominante (permite observar 2 alelos en el heterocigota) y multialélica mostrando una alta información polimórfica
- Son altamente reproducibles y automatizables (por el uso del secuenciador automático).

Las desventajas son:

- No se han desarrollado en todas las especies
- El desarrollo de los microsatélites es altamente costoso
- Generalmente se requiere la utilización de geles de secuenciación y tinción con nitrato de plata, autoradiografía o fluorescencia (secuenciador automático).

Fig.5: Representación esquemática de la obtención de polimorfismos mediante la técnica de SSR. En la parte inferior de la figura se observa un gel con distintos los distintos genotipos indicando la composición de los alelos. Las flechas indican la posición de los "primers".



3.4.3.4. AFLP

Recientemente se ha desarrollado una nueva técnica que utiliza ambos métodos (digestión y amplificación) para detectar variabilidad. Se la denomina polimorfismo de longitud de fragmentos amplificados (AFLP) y combina la presencia o ausencia de sitios de restricción y la existencia de polimorfismos de secuencia adyacente a esos sitios (ver Fig. 6). Los AFLP fueron desarrollados por Zabeau y Vos (1993) y por Vos *et al.* (1995). Se basan en la restricción de ADN con dos enzimas de restricción, una de corte poco frecuente, como *EcoRI* (que reconoce una secuencia de 6 bases) y la otra, *MseI* (que reconoce una secuencia de 4 nucleótidos) con una frecuencia mucho más alta. Una vez generados estos fragmentos, los mismos son ligados a adaptadores doble cadena para cada uno de los sitios de restricción obtenidos. De esta manera se obtienen secuencias de ADN con sus puntas conocidas como para amplificarlas por medio de la técnica de PCR. Los fragmentos que se obtienen son de tres tipos según los extremos agregados:

- ambos extremos con sitios *EcoRI*;
- ambos extremos con sitios *MseI*
- con extremos distintos.

De esta manera el número de productos obtenidos es muy grande (dependiendo de la complejidad del genoma) e imposible de analizar en una sola corrida electroforética. Para disminuir la complejidad del patrón de bandas se realiza una segunda amplificación mediante PCR con oligonucleótidos selectivos los cuales poseen bases nucleotídicas adicionales en los extremos 3'. Luego de la amplificación, los fragmentos producidos se separan mediante electroforesis en un gel de poliacrilamida y se tiñen con nitrato de plata o bien se utiliza marcación radiactiva y se revelan autoradiográficamente (ver Materiales y Métodos). También pueden evidenciarse en sistemas de secuenciación nucleotídica automática marcados con fluorocromos.

Según la técnica empleada para revelar el gel, pueden observarse distintos productos. Así por ejemplo si se marca con nucleótidos radiactivos o fluorescentes el oligonucleótido *EcoRI*, sólo se verán los fragmentos que posean al menos un extremo *EcoRI* en su secuencia. En cambio, si se utiliza la tinción con plata, se verán todos los fragmentos que se hubieran amplificado, independientemente de los extremos, dependiendo entonces de la magnitud de la amplificación y del tamaño. Si bien el mayor número de fragmentos que se am-

plifican poseen sitios *MseI* a ambos lados, como son de tamaño muy pequeño, se pierden con el frente de corrida del gel y no se visualizan. Por lo tanto, en general sólo se evidencian los fragmentos *EcoRI-EcoRI* y los *EcoRI-MseI*, independientemente del método de tinción que se emplee.

Estos marcadores moleculares (así como los RAPD) en general son de visualización dominante, ya que raras veces el alelo produce amplificación productiva o, en el caso de hacerlo, se requiere de cruzamientos para confirmar que se trata de alelos. Por otro lado, la ausencia compartida de una banda entre dos genotipos (que comparten el "alelo" nulo) no se considera como criterio de relación genética porque suele estar causada por mutaciones no relacionadas (causantes de este comportamiento). La falta de multiallelismo y la imposibilidad de contabilizar las dos variantes alélicas reducen notablemente el contenido de información polimórfica aportado por este tipo de marcadores. Comparados con los RFLP y SSR, el número de alelos polimórficos es menor, pero el número de *loci* que se evalúa en una única combinación de primers es mucho mayor y por lo tanto son más efectivos en la cobertura y representación del genoma. Los AFLP tienen la ventaja de que no se necesita conocimiento previo de secuencia para su uso, y con una sola reacción se evalúan varias regiones del genoma simultáneamente. Asimismo, el uso de AFLP ha evidenciado gran utilidad en especies que han presentado bajo nivel de polimorfismo con RFLP y RAPD, (Maughan *et al.*, 1996).

Resumiendo:

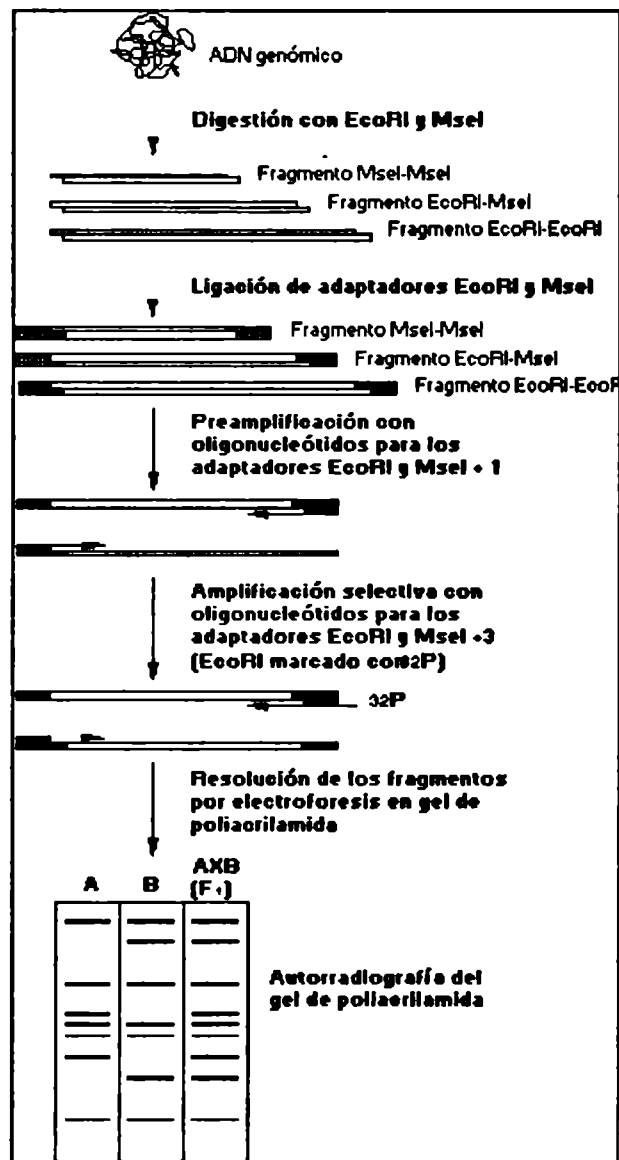
Las ventajas de los AFLP son:

- El gran número de *loci* ensayados simultáneamente.
- Son muy reproducibles debido a la exigente temperatura de hibridación durante la PCR.
- No se requiere información previa, y puede aplicarse a cualquier organismo

Las desventajas son:

- Son marcadores de visualización dominante (igual que los RAPD)
- Requieren una buena calidad de ADN.
- Requiere de la utilización de geles de secuenciación y tinción con nitrato de plata, autoradiografía o fluorescencia (secuenciador automático).

Fig.6: Representación esquemática de la obtención de polimorfismos mediante la técnica de AFLP.



4. Antecedentes de aplicación de marcadores moleculares en *Solanum*

La mayoría de los análisis de filogenia que existe en estas especies de *Solanum* se basan principalmente en estudios biosistemáticos (Hawkes, 1989; Hawkes y Herting, 1969; Okada, 1976; Okada y Clausen, 1982; Clausen y Crisci, 1989; etc.). También se han llevado a cabo estudios aloenzimáticos en la década del 80 por el grupo español formado por Martínez-Zapater y Oliver y por Quirós en Davis, California, entre otros.

En los últimos años se han llevado a cabo un gran número de estudios taxonómicos y de variabilidad genética mediante RFLP y/o RAPD en numero-

esos géneros como *Brassica* (Mc Grath *et al.*, 1992), *Vicia* (Van de Ven *et al.*, 1993), *Vigna* (Fatokun *et al.*, 1993), *Phaseolus* (Chase *et al.*, 1991; Paredes *et al.*, 1993), *Actinidia* (Crowhurst *et al.*, 1990), *Oryza* (Ishii *et al.*, 1993) y también en los géneros *Lycopersicon* (Miller *et al.*, 1990) y también, más específicamente, en *Solanum* (ver más adelante).

La utilización de marcadores moleculares con el objetivo de discriminar entre las distintas especies permitió también la posibilidad de detectar fragmentos introgresados en la papa cultivada (Debener *et al.*, 1990; Waugh *et al.*, 1992). Esta estrategia fue posible gracias a la existencia de sondas que detectan *loci* polimórficos que mapean en los doce grupos de ligamiento de papa (Gebhardt *et al.*, 1989); como así también al desarrollo del mapa de tomate, especie altamente emparentada (Bernatzky y Tanksley, 1986) cuyas sondas, al ser ensayadas en papa, revelaron colinearidad en casi todos los grupos de ligamiento, con la excepción de algunas inversiones. El hallazgo de bandas específicas de especie obtenidas a partir de cualquier marcador molecular es la manera más adecuada de utilizar estas variables como caracteres discriminantes para fines taxonómicos y/o filogenéticos. En cuanto a la conservación en los bancos de germoplasma, un análisis de esta naturaleza contribuye sin duda a la determinación del número de entradas necesarias para conservar la mayor información posible con un mínimo número de muestras (Miller y Tanksley, 1990).

4.1. RFLP

A partir de la década de 1990 se publicaron varios estudios de filogenia en el género *Solanum*. Debener *et al.* (1990) analizaron 14 especies silvestres y 3 cultivadas del género, encontrando relaciones filogenéticas que concordaron con otros estudios basados en datos biosistemáticos. Un estudio similar pero a nivel intraespecífico fue llevado a cabo por Hosaka *et al.* (1992) mediante la utilización de RFLP. Este grupo estudió la variabilidad de la especie *S. acaule* y comparó los patrones obtenidos entre las distintas subespecies. En términos generales encontró coincidencias con la taxonomía ya propuesta y fue

capaz de agrupar algunas poblaciones de una de ellas según el área geográfica.

También en el género *Solanum* se llevaron a cabo análisis de los ADNs de cloroplastos y se determinaron distintos patrones capaces de agrupar a las especies en 5 tipos de ADNs cloroplastídicos (Hosaka, 1986). La mayoría de las especies que aquí se analizan fueron agrupadas en el tipo W con la excepción de *S. acaule*, *S. tuberosum* (las 2 ssp.) y *S. tarjense*, siendo, por lo tanto, esta estrategia poco útil para la separación de estos taxones, dado el alto grado de conservación del ADN de esta organela. Más recientemente Spooner *et al.*, (1997) realizaron un estudio abarcando genotipos de casi todas las series taxonómicas (Hawkes, 1990) también mediante evaluación de ADN de cloroplastos. En él, nuevamente se demuestra el bajo poder resolutivo que ofrece esta herramienta en el clado que abarca a los genotipos analizados en nuestro trabajo y se sugiere la aplicación de otros marcadores de herencia biparental y menos conservados para resolver las cuestiones evolutivo-taxonómicas de este grupo.

4.2. RAPD y Microsatélites

En los últimos años el avance en el desarrollo de nuevos marcadores moleculares ha posibilitado la generación de resultados de manera más eficiente y rápida. Las tendencias actuales pretenden complementar y/o reemplazar a los laboriosos y costosos RFLP por marcadores obtenidos a partir de amplificación "in vitro" mediante PCR. Se desarrollaron los RAPD, antes mencionados, como sistemas pioneros basados en esta estrategia. Si bien siguen utilizándose con éxito en numerosos casos, cabe mencionar que su reproducibilidad puede ser difícil de conseguir, no obstante fueron exitosamente utilizados en papa para determinación de híbridos somáticos (Baird *et al.*, 1992).

A posteriori, se desarrollaron los microsatélites, (Powell *et al.*, 1996, Provan *et al.*, 1996, Kashi *et al.*, 1997, Milbourne D *et al.*, 1998). Estas secuencias se encuentran distribuidas por todo el genoma, y las secuencias flanqueantes son específicas y están relativamente conservadas entre individuos del mismo

género, como se comprueba en este trabajo (no así el número de veces que se encuentran repetidos los motivos internos).

Estas técnicas han sido utilizadas tanto para construcción de mapas genéticos cuanto para la identificación de genotipos, cultivares, pureza de semillas, etc. en numerosas especies (para una revisión reciente ver Mohan *et al.*, 1997).

4.3. AFLP

A partir de 1993 comenzó a utilizarse una nueva herramienta que ofrece las ventajas de los RFLP, combinada con la amplificación "in vitro" de dichos productos mediante PCR (como se mencionó en 3.4.3.4). Recientemente se publicó un catálogo de marcadores AFLP para el alineamiento de mapas de papas (van der Voort *et al.*, 1998) también a disposición en la página de internet: <http://www.spg.wau.nl/pv/aflp/catalog.htm>. Se realizaron estudios de variabilidad en papas cultivadas, (Milbourne *et al.*, 1997; Kim *et al.*, 1998), además se desarrollaron numerosos estudios de mapeo en este género como resistencia al nematode (locus *Gpa2*), (vander Voort *et al.*, 1997), a tizón tardío locus *R1* (Mesksem *et al.*, 1995) entre otros.

Para estudios de biodiversidad y variabilidad biológica esta herramienta ha sido utilizada en café, (Robbie Waugh, comunicación personal), té (Paul *et al.*, 1997), soja (Giancola, 1998), forestales (Marcucci Poltri *et al.*, en preparación), *Triticum monococcum* para la determinación del lugar de domesticación del trigo (Heun M *et al.*, 1997), etc.

En el presente trabajo se analiza la variabilidad genética de un grupo de 67 genotipos de papas silvestres argentinas mediante distintas herramientas.

- Caracterización morfológica: Basada en datos obtenidos del Banco de Germoplasma NRSP-6 Sturgeon Bay, Wisconsin (Bamberg *et al*, 1996).
- Caracterización citogenética: estructura de cariotipos y contenido de ADN nuclear
- Caracterización molecular: Polimorfismos para fragmentos de restricción de los genes ribosomales
- RFLP de genes de bajo número de copias y de copia única, AFLP y microsatélites (SSR).

Hipótesis de trabajo

Los marcadores moleculares son herramientas que permiten evaluar la variabilidad y determinar distancias genéticas entre individuos de un mismo género, especie y/o entrada taxonómica mejorando o complementando, eventualmente, los datos deducidos por criterios morfológicos, fenológicos, fisiológicos y citogenéticos clásicamente utilizados en este género de especies por botánicos y agrónomos. Por lo tanto, la clasificación en series propuesta por Hawkes 1990 (y su hipótesis de historia evolutiva), puede ser validada mediante marcadores moleculares. Éstos pueden proveer, además, de un método científico sencillo para tomar decisiones en cuanto a la cuantificación y evaluación de la variabilidad genética con el objeto de conservación de muestras en bancos de germoplasma.

Objetivo general

- Evaluar la variabilidad genética intra- e interespecífica de un grupo argentino de especies silvestres afines a la papa (*Solanum tuberosum* ssp. *tuberosum*), pertenecientes a la sección *Petota* Dum (D'Arcy, 1972), subsección *Potatoe* G. Don; utilizando distintas herramientas: citológicas y moleculares.

Objetivos parciales

- **Cuantificar y evaluar la variabilidad (y la capacidad de discriminación intra- e interespecífica) de los genotipos estudiados en esta tesis considerando aspectos citológicos y moleculares.**
- **Establecer si existen criterios útiles para la taxonomía a través de observaciones citológicas de los cromosomas.**
- **Establecer el contenido de ADN de estas especies.**
- **Evaluar el efecto de la poliploidización en cuanto a conservación o pérdida importante del ADN durante dicho proceso**
- **Evaluar la variabilidad genética del germoplasma a través de la información de datos botánicos y agronómicos del grupo extraídos de las bases de datos de los bancos de germoplasma**
- **Analizar la posible utilidad de los polimorfismos de las regiones que codifican para el ARN ribosomal, que frecuentemente se utilizan en estudios de variabilidad genética.**
- **Estimar la variabilidad presente en el germoplasma de papa que no forma parte de este cultivo y que serviría para aumentar la base genética para su mejoramiento**
- **Estimar el porcentaje de homocigosis de los genotipos.**
- **Analizar la importancia relativa de cada muestra a conservar en los bancos de germoplasma.**
- **Establecer bandas diagnósticas de las especies.**
- **Establecer las relaciones genéticas (y, por ende, evolutivas) que existen entre los distintos genotipos mediante distintas aproximaciones metodológicas.**
- **Contrastar los resultados obtenidos con cada técnica utilizada, con la clasificación taxonómica tradicional (y su hipótesis evolutiva), basada en Hawkes (1990) y Hawkes and Jackson, 1992.**
- **Determinar si existen agrupamientos de individuos consistentes con la procedencia geográfica.**
- **Comparar los índices de diversidad o de contenido polimórfico obtenidos con cada marcador y evaluar su aplicabilidad para estudios similares.**

MATERIALES

Y

MÉTODOS

1. Material vegetal

1.1. Clasificación, distribución geográfica y citotipos

Las plantas estudiadas (73 genotipos se utilizaron en los análisis de variabilidad de los genes ribosomales y 67 se utilizaron para el estudio comparativo mediante marcadores moleculares) pertenecen al género *Solanum* sección *Petota*, subsección *Potatoe*, Superseries *Stellata* y *Rotata* y a diferentes series taxonómicas (Hawkes, 1990). La mayoría habitan el Noroeste argentino, aunque algunas pertenecen a la región mesopotámica del país. Son fundamentalmente especies silvestres, pero se incluyeron algunas especies cultivadas como *S. phureja*, *S. tuberosum* ssp. *tuberosum*, *S. tuberosum* ssp. *andígena* y ; dos entradas pertenecientes al banco de germoplasma del CIP (Lima, Perú) (*S. verrucosum* y *S. gonio-calyx*). También se consideraron para algunos análisis los cultivares comerciales Huinkul MAG, Baraka, Maris Piper, King Edward.

Entre los genotipos estudiados, hay tres grupos de individuos considerando los distintos niveles de ploidía, mayoritariamente los citotipos son diploides, aunque también se analizaron citotipos tetraploides y hexaploides.

En la Tabla 2 se detallan todos los genotipos utilizados durante este trabajo, la clasificación taxonómica (Hawkes, 1990), sus ploidías, sus números de entrada del banco de germoplasma de la EEA INTA Balcarce y su procedencia geográfica.

En la Tabla 3 se indican los números de entrada del Banco de Germoplasma de Sturgeon Bay y las coordenadas geográficas.

Tabla 2: Material biológico estudiado.

In- div	Especies y subespecies	Entrada	Localidad, (provincia, de- partamento)	plodia	Código	Superseries	Series			
1	<i>S. chacoense</i>	Oka 6116	La Rioja, dpto Capital	2x	chc 6116	Stellata	IX Yungasense			
2		Oka +L uc 4957	Catamarca, dpto Poman Mu- tquin		chc 4957 1					
3					chc 4957 2					
4					chc 4957 3					
6					chc 4957 c					
8					chc 2955 c					
9		Oka 2955	Salta		chc 2955 2					
11					chc 5341					
12			Oka 7546		Jujuy, dpto Tumbaya			chc 7546		
13				chc 7546 3						
14		Oka 7309	Corrientes, dpto San Cosme	chc 7309						
16		Oka +Luc 4810	Córdoba, dpto Santa Rosa de Calamuchita	chc 4810 80						
17				chc 4810						
19	<i>S. commersonii</i> ssp <i>malmeanum</i>	Oka 7310	Santa Fé, dpto Gral Obligado	2x	cmm 7310	Stellata	V Commersoniana			
20		Oka 7313	Entre Ríos, dpto Parana		cmm 7313					
21		Oka + Cla 7254	Entre Ríos, dpto Gualeguaychú		cmm 7254					
22		Oka + Cla 7270	Corrientes, dpto Monte Caseros		cmm 7270					
23		Oka 7292	Entre Ríos, dpto Feliciano		cmm 7292					
23		Oka 5611	Salta, dpto Rosario de Lerma		cmm 5611					
24		<i>S. kurtzianum</i>	OkaLuc 4937		Catamarca, dpto Belén			ktz 4937	Rotata	XVI Tuberosa
25			OkaLuc 4946		Catamarca, dpto Anadalgala			ktz 4946		
26			OkaLuc 4964		Catamarca, dpto Anadalgala			ktz 4964		
27			OkaLuc 4971		Catamarca, dpto Anadalgala			ktz 4971		
28			Oka 4986		La Rioja, dpto General Lavalle			ktz 4986		
29			Oka 5889		Salta, dpto Sta. Victoria			tar 5889		
30			Oka 5882		Salta, dpto Sta. Victoria			tar 5882		
31			Oka 5891		Salta, dpto Sta. Victoria			tar 5891		
32			Oka 5633		Salta, dpto Chicoana			tar 5633		
33			<i>S. spegazzinii</i>		Oka 6108			Catamarca, dpto Andalgalá	spg 6108	Rotata
34		Oka 6147			Catamarca, dpto Belén			spg 6147		
35	Oka 4201	La Rioja, dpto Famatina		spg 4201						
36	Oka 3787	Salta, dpto Chicoana		mga 3787						
37	Oka 4430	Jujuy, dpto Ticara		mga 4430						
38	Oka 7504	Salta, dpto Chicoana		mga 7504						
39	<i>S. microdonum</i> ssp <i>malmeanum</i>	Oka 6881		Salta,	mcd 6881	Rotata	XVI Tuberosa			

in-div	Especies y subespecies	Entrada	Localidad, (provincia, departamento)	ploidia	Codigo	Superseries	Series
40	<i>ssp gigantophyllum</i>	Oka 7530	Salta, dpto Rosario de Lerma		mcd 7530		
41	<i>S. microdontum</i>	Oka 7493	Salta, dpto Chiocoana		mcd 7493		
42	<i>ssp microdontum</i>	Oka 4398	Jujuy, dpto Tilcara		mcd 4398		
43	<i>ssp. microdontum</i>	Oka 7634	Salta, dpto Orán		mcd 7634		
44	<i>S. venturii</i>	Oka 7609	Jujuy, dpto Tilcara	2x	vnt 7609	Rotata	XVI Tuberosa
45		Oka 7618 B	Jujuy, dpto Tilcara		vnt 7618B		
46		Oka 7619 A	Jujuy, dpto Tilcara		vnt 7619A		
47		Oka 7585	Jujuy, dpto Capital		vnt 7585		
48	<i>S. vernel</i>	Oka 7614	Jujuy, dpto Tilcara	2x	vrn 7614	Rotata	XVI Tuberosa
49		Oka 7617	Jujuy, dpto Tilcara		vrn 7617		
50		Oka 7586	Jujuy, dpto Capital		vrn 7586		
51	<i>S. infundibuliforme</i>	Oka 5798	Jujuy, dpto Santa Catalina	2x	lfd	Rotata	XII Cuneolata
52	<i>S. gourlayi</i>	Oka 4837	Salta, dpto La Poma		grl 4837		
53	<i>ssp. saltense</i>	Oka 4841	Salta, dpto La Poma		grl 4841		
54	<i>ssp. saltense</i>	Oka 5421	Jujuy, dpto Humahuaca		grl 5421	Rotata	XVI Tuberosa
55	<i>S. gourlayi</i>	Oka 7680	Salta, dpto Cachi		grl 7680		
56	<i>ssp gourlayi</i>	Oka 3804	Jujuy, dpto Tilcara		grl 3804		
57	<i>S. oplocense</i>	Oka 5503	Jujuy, dpto Santa Catalina		opl 5503	Rotata	XVI Tuberosa
58		Oka 5476	Jujuy, dpto Yavi		opl 5476		
59		Oka 3964	Jujuy, dpto Santa Catalina		opl 3964		
60		Oka 5478	Jujuy, dpto Yavi		opl 5478		
61	<i>S. acaule ssp acaule</i>	Oka 4377	Jujuy, dpto Tilcara	4x	acl 4377	Rotata	XVII Acaulia
62		Oka 5756	Jujuy, dpto Yavi		acl 5756		
63		Oka 4005	Jujuy, dpto Rinconada		acl 4005		
64		Oka 7648	Salta, dpto Rosario de Lerma		acl 7648		
65	<i>S. tuberosum ssp andigena</i>	clon 799	Jujuy, dpto Valle Grande (3500m)	4x	adg 799	Rotata	XVI Tuberosa cultivada
66		clon 668 a	Jujuy, dpto Yavi (3442m)		adg 668		
67		clon 557	Jujuy, dpto Yavi (3442m)		adg 557		
68		clon 493	Salta, dpto Santa Victoria (2400m)		adg 493		
69		clon 662	Jujuy, dpto Yavi (3440m)		adg 662		
70		clon 483	Salta, dpto Santa Victoria (2700m)		adg 483		
71		clon 796	Jujuy, dpto Valle Grande (3500m)		adg 796		
72		Oka 7507	Salta, dpto Cachi		adg 7507		
73	<i>S. tuberosum ssp tuberosum</i> var <i>Huinkul Mag</i>			4x	Huinkul MAG	Rotata	XVI Tuberosa cultivada
74	<i>Lycopersicon esculentum</i> var <i>platense</i>			2x	tomate		
75	<i>S. goniocalyx</i>			2x	goniocalyx		
76	<i>S. verrucosum</i>			2x	verrucosum		
77	<i>S. phureja</i>			2x	phureja	Rotata	XVI Tuberosa cultivada

Tabla 3. Coordenadas geográficas de los genotipos estudiados ordenados en cline de NE-SE. Se recuadraron los genotipos que comparten la posición geográfica. En la primera columna se indica el número de entrada del Banco de Germoplasma de Sturgeon Bay, en la segunda, el nro de orden utilizado en este trabajo, en la tercera el nombre taxonómico, en la cuarta, el coleccionista, en la quinta la latitud en grados (S), en la sexta, la longitud en grados (O), en la séptima la altitud en metros y en la octava, otros genotipos que cohabitan.

Sturgeon Bay	Nro orden	Nombre	Coleccionista	Latitud S	Longitud O	Altitud	Genotipos Vecinos
225707	77	<i>S. phureja</i> ccc81		05.43N	73.22O		
442685	59	<i>S. oplocense</i>	Oka 3964	21.53	66.11	3700	tub3943
473193		<i>S. oplocense</i>	Oka5503	21.53	66.11	3800	acisspac15496
		<i>S. tuberosum ssp andigena</i>	cl 668	22.06	65.36	3442	
473189	58	<i>S. oplocense</i>	Oka 5476	22.06	65.28	3400	adg5471
473196	60	<i>S. oplocense</i>	Oka 5478	22.06	65.28	3400	adg5471
		<i>S. tuberosum ssp andigena</i>	cl 662	22.07	65.28	3440	
472909	51	<i>S. tuberosum ssp andigena</i>	cl 493	22.14	65.03	2400	
		<i>S. tuberosum ssp andigena</i>	Oka 5798	22.15	66.21	3860	
		<i>S. infundibuliforme</i>	cl 483	22.15	65.04	2700	
473231	30	<i>S. tenjense</i>	Oka 5882	22.16	64.58	2560	
473237	29	<i>S. tenjense</i>	Oka 5889	22.16	64.58	2560	
473239	31	<i>S. tenjense</i>	Oka 5891	22.16	64.58	2560	
472762	62	<i>S. acaule ssp acaule</i>	Oka 5756	22.19	65.21	3900	
472678	63	<i>S. acaule ssp acaule</i>	Oka 4005	22.27	66.11	4000	
473312	39	<i>S. microdontum ssp malmeanum</i>	Oka 6881	22.44	65.14	3050	
558078		<i>S. gourlayi ssp gourlayi</i>	Oka 7626	22.56	65.19	3500	ifd7626b,mga7626c
473094	54	<i>S. Gourlayi ssp gourlayi</i>	Oka 5421	22.58	65.26	3600	aclaci5420
558151	49	<i>S. vernei ssp vernei</i>	Oka 7617	23.36	65.11	3100	
558119	46	undetermined	Oka 7619 A	23.36	65.11	3100	vm7617
558108		<i>S. oplocense</i>	Oka 7592	23.10	65.11	3500	7590,7591
558100	43	<i>S. microdontum (ssp microdontum?)</i>	Oka 7634	23.12	64.55	2400	
		<i>S. tuberosum ssp andigena</i>	cl 796	23.20	65.02	3500	
		<i>S. tuberosum ssp andigena</i>	cl 799	23.20	65.02	3500	
473003	56	<i>S. gourlayi ssp gourlayi</i>	Oka 3804	23.34	65.26	2850	gr13802
473133		<i>S. megistacrobium ssp megistacrobium</i>	Oka4430	23.34	65.16	3900	indursi4427
558127	44	<i>S. venturii (undet)</i>	Oka 7609	23.35	65.13	2950	mcd7611
558120	46	<i>S. venturii</i>	Oka 7619B	23.36	65.11	3100	
558150		<i>S. vernei ssp vernei</i>	Oka 7614	23.36	65.11	3350	
558118	45	<i>S. venturii</i>	Oka 7618A	23.36	65.11	3100	
472701	61	<i>S. acaule ssp acaule</i>	Oka 4377	23.36	65.08	3200	
458355	42	<i>S. microdontum (ssp microdontum?)</i>	Oka 4398	23.38	65.08	2700	mcd7545
558088		<i>S. infundibuliforme</i>	Oka 7652K	23.56	66.21	3700	
508044	12	<i>S. chacoense</i>	Oka 7546	23.58	65.27	2000	

Sturgeon Bay	Nro orden	Nombre	Coleccionista	LatitudS	Longitud O	Altitud	Genotipos Vecinos
472821	7	<i>S. chacoense</i>	Oka 5611	24.48	65.42	2150	
500067	50	<i>S. vermei ssp vermei</i>	Oka 7586	24.03	65.36	2700	gr177677
558122	47	undetermined	Oka 7585	24.07	65.38	3150	
500013	64	<i>S. ecaule ssp ecaule</i>	Oka 7648	24.19	66.07	3500	
458345	52	<i>S. gourleyi ssp. saifense</i>	Oka 4837	24.32	66.12	3900	
473065		<i>S. gourleyi ssp gourleyi</i>	Oka 4841	24.33	66.12	3900	7671varBakbach a
558097	40	<i>S. microdontum ssp gigantophyllum</i>	Oka 7530	24.37	65.35	3350	
558145		<i>S. tuberosum ssp andigena</i>	Oka 7674	24.39	66.12	3300	SPE7506
500050		<i>S. spegazzinii</i>	Oka 7506	25.04	66.02	3200	IFD,MGA
558137	72	<i>S. tuberosum ssp andigena</i>	Oka 7507	25.04	66.02	3200	
558084		<i>S. gourleyi ssp gourleyi</i>	Oka 7680	25.06	66.23	3500	VRN7502
435077	36	<i>S. megistacrolobum ssp megistacrolobum</i>	Oka 3787	25.08	65.52	3500	
500029	38	<i>S. megistacrolobum ssp megistacrolobum</i>	Oka 7504	25.10	65.52	3450	
500032	41	<i>S. venturii?</i>	oka7657	25.11	65.51	3000	
473221	32	<i>S. microdontum</i>	Oka 7493	25.11	65.48	2100	
558129		<i>S. tarijense</i>	Oka 5633	25.11	65.48	2100	
414144	8	<i>S. tarijense</i>	Oka 7494	25.11	65.48	2100	
498325	14	<i>S. chacoense</i>	Oka 2955	25.50	65.30	1750	
472938	26	<i>S. kurtzianum HYB?chc</i>	Oka 7309	27.21	58.32	60	
458338	34	<i>S. spegazzinii</i>	Oka-Luc 4964	27.27	66.26	1960	
458329	27	<i>S. kurtzianum</i>	Oka 6147	27.29	67.05	1920	
472931	24	<i>S. kurtzianum</i>	Oka-Luc 4971	27.39	66.12	900	
458328	25	<i>S. kurtzianum</i>	Oka-Luc 4937	27.40	67.00	1250	
458314	2	<i>S. chacoense</i>	Oka-Luc 4946	27.43	66.39	1200	
472854	19	<i>S. commersonii ssp malmeanum</i>	Oka +L uc 4957	28.18	66.09	1700	
472819	11	<i>S. chacoense</i>	Oka 7310	28.20	59.17	50	
442687	35	<i>S. spegazzinii</i>	Oka 5341	28.21	65.38	900	
472829	1	<i>S. chacoense</i>	Oka 4201	28.52	67.35	1800	
472947	28	<i>S. kurtzianum</i>	Oka 6116	29.14	66.51	1100	
472850	23	<i>S. commersonii ssp malmeanum</i>	Oka 4986	29.25	68.00	1300	
472845	22	<i>S. commersonii ssp malmeanum</i>	Oka 7292	30.12	58.56	62	
472855	20	<i>S. commersonii ssp malmeanum</i>	Oka + Cia 7270	30.12	57.42	50	
472813	16	<i>S. chacoense</i>	Oka 7313	31.46	60.32	74	
472843	21	<i>S. commersonii ssp malmeanum</i>	Oka +Luc 4810	31.57	64.47	1100	
116163	76	<i>S. verrucosum</i>	Oka + Cia 7254	33.22	58.32	20	
566777	67	<i>S. kurtzianum</i>	Oka 6138			1900	
		<i>S. tuberosum ssp andigena</i>	cl 557				

1.2. Mantenimiento y cultivo del material

Se partió de semillas cuando las plantas eran silvestres o de clones cuando eran cultivares; en ambos casos los individuos fueron cultivados en macetas dentro de invernaderos y también introducidas "in vitro" y micropropagadas periódicamente en medio MS (Murashige-Skoog, 1962) en cámaras de cultivo adecuadas. Para la esterilización del material (semillas o estacas) se ensayaron distintos métodos que se basan en la utilización de lavandina comercial en distintas concentraciones y durante distintos tiempos. Se comprobó que para las semillas fue suficiente una incubación a temperatura ambiente durante 10 min con una solución de lavandina comercial al 7% en agua destilada estéril; en cambio para explantos provenientes de plantas crecidas en macetas sólo fue necesario 4% de la misma solución. En ambos casos se quitó la solución desinfectante enjuagando 3 veces con abundante agua destilada estéril.

Los productos químicos utilizados en el trabajo de laboratorio fueron de calidad analítica o biología molecular producidos y/o comercializados por las compañías Sigma Chemical Co. (EUA), Merck Biochemica (Alemania), Mallinkrodt (EUA), Sintorgan (Argentina), Fluka (Suiza), Aldrich (EUA), Carlo Erba (Italia) y Riedel van Haen (Holanda).

El uracilo conjugado con digoxigenina (Dig-UTP), el anticuerpo (anti-digoxigenina), y el agente bloqueante utilizados en la detección no isotópica fueron producidos por Boehringer Mannheim (Alemania), y el sustrato quimioluminiscente de Tropix (EUA).

Los isótopos radiactivos fueron adquiridos a NEN-DuPont (EUA).

Las enzimas de restricción, la Taq polimerasa y la ARNasa fueron de Gibco-BRL (EUA), New England Biolabs (EUA), Promega Biotech (EUA), Perkin Elmer (EUA).

2. Citología

2.1. Fuente de células

Se realizó en ápices radiculares coleccionados de plantas cultivadas "in vitro". Una vez que aparecieron las raíces se realizaron observaciones al microscopio, previa tinción con fuccina básica (colorante de Feulgen, ver 2.2.) de los ápices radiculares en distintos momentos y se determinó que aproximadamente a partir del séptimo y hasta el décimo primer día de repicadas el número de células involucradas en divisiones mitóticas era suficiente para los estudios que iban a desarrollarse.

2.2. Recuentos Cromosómicos y Cariotípicos

El estudio se inició efectuando todos los recuentos cromosómicos de los individuos a analizar mientras se fue ajustando la técnica para la construcción de los cariotipos.

2.2.1. Pretratamiento y fijación de las células

Para una adecuada contracción de los cromosomas se ensayaron distintos pretratamientos (colchicina, 8-hidroxiquinoleína, 1-bromofenol) durante diferentes tiempos y concentraciones. (de Azkue y Martínez, 1990, Pijnacker *et al.*, 1986). Todos los agentes químicos probados produjeron gran contracción cromosómica dificultando la observación de las constricciones primarias y secundarias. Debido a que los tratamientos tradicionales no eran útiles en nuestro material, se incubaron los ápices en H₂O durante 24 hs a 0°C con excelentes resultados. Luego se fijaron en EtOH:AcOH 3:1 durante 48 hs y posteriormente se conservaron en EtOH 70% a 0°C hasta su utilización. Para ablandar el tejido se trataron con solución de pectinasa (Sigma) al 15% v/v por 1 - 1 y 1/2 hs a temperatura ambiente.

2.2.2. Tinción de cromosomas

Para la observación de los cromosomas se utilizó la tinción con colorante de Schiff (fuccina básica o colorante de Feulgen) durante 30-60 min (Tempelaar, 1980).

Fundamentos de la coloración:

Esta técnica se basa en la unión específica de la fuccina básica al aldehído que se genera al depurinar el ADN con ácido. La molécula de fuccina cuando está libre presenta estructura tetrahédrica y no es coloreada, pero al unirse y formarse dobles enlaces que resuenan se vuelve coloreada. La unión es específica a las deoxirribosas y no da reacción con las ribosas. Como se indicó recientemente para que el colorante de Schiff actúe es necesario una hidrólisis ácida de los ápices (HCl 1N a 60°C) durante 8 min y la posterior tinción con la solución de fuccina. Como colorante de contraste se empleó aceto-orceína.

2.2.3. Construcción de cariotipos

Por razones de índole práctica sólo se analizaron los cariotipos de las especies diploides, $2n=24$ ya que las tetraploides y hexaploides fueron muy difíciles de estudiar debido al escaso tamaño y alto número de cromosomas.

Se midieron los cromosomas de una placa metafásica por entrada en la mayoría de los casos. Las mismas fueron observadas en el microscopio con un aumento de 1000X y fotografiadas para su posterior análisis. Las mediciones de las longitudes de los brazos cromosómicos se efectuaron directamente en los negativos empleando una lupa con una lente graduada. La construcción de los cariotipos se realizó con ayuda de un programa de computación confeccionado por el Dr. J. Dubcovsky. En él se analizaron las longitudes de los complementos genómicos, los coeficientes de variación entre cromosomas, la relación del par cromosómico mayor sobre el menor, la razón de brazos promedio (RBP) de cada complemento cromosómico, y se estableció una correlación entre la longitud de cada cromosoma y la RBP.

2.3. Medición del Contenido de ADN

2.3.1. Descripción de la técnica

La determinación del contenido de ADN se realizó por microdensitometría en tejidos no pretratados. Esta metodología se basa en la medición de la intensidad de coloración de núcleos telofásicos teñidos con fuccina básica pero con condiciones altamente estandarizadas como se indicará posteriormente.

2.3.2. Muestreo

Se evaluó el contenido de ADN de una entrada por cada especie y se midieron 5 -7 individuos de cada una de las entradas. De cada individuo se tomaron aproximadamente 20 datos en 5 oportunidades distintas y para evitar variaciones entre las mediciones se midieron todas las especies en forma conjunta cada vez con su testigo correspondiente. Se midieron entonces aproximadamente 100 telofases por especie.

2.3.3. Condiciones de los núcleos medidos

Los ápices radiculares se encuentran en activa división mitótica, por lo tanto para determinar el contenido 2C de los individuos hay que discriminar todas aquellas células que estén sintetizando su ADN (período S del ciclo celular) y que sobreestimarían el contenido 2C. Por ello se midieron telofases, y para discernir las tempranas de las tardías se evaluaron sólo las que no mostraban presencia del nucléolo. En un trabajo en donde se critica la metodología y se sugieren opciones para la unificación de los criterios (para no incurrir en errores sistemáticos y concluir que existe variación intraespecífica de gran envergadura como en algunos casos), se midieron telofases tardías o profases tempranas, pero siempre los

mismos estadios, ya que se observaron variaciones según la contracción cromosómica (Greilhuber y Ebert, 1994).

2.3.4. Condiciones del aparato

Se utilizó un microdensitómetro Zeiss con platina móvil. Los núcleos fueron barridos con el objetivo de inmersión de 100X. El diámetro del diafragma lector fue fijado en $0,50\mu$, a diferencia del paso de lectura que fue de $0,25\mu$. La longitud de onda empleada en el barrido fue de 560 nm como se había determinado en otros trabajos (Jacobsen *et al.*, 1983; Martínez y Ginzo, 1985).

2.3.5. Precisión del aparato

Se determinó midiendo quince núcleos, tres lecturas de cada uno y se comprobó que los coeficientes de variación oscilaban alrededor del 3%, salvo para el caso de pequeños valores de absorbancia (0,97-1,40 unidades arbitrarias), en los que llegó hasta un 11%.

2.3.6. Cuantificación del ADN

Para que el resultado sea válido se estandarizaron las condiciones de fijación, tinción y medición. Todas las lecturas se refirieron a un patrón de contenido de ADN conocido que se midió en cada oportunidad. Se unificó el pH del colorante a 3,6 y el tiempo de tinción (1 hr a 22°C). Para eliminar el colorante unido inespecíficamente al tejido, se efectuaron lavados con agua sulfurosa (3x10 min) que vuelven la estructura plana de la molécula de fuscina a la forma tetrahédrica no coloreada.

2.3.6.1. Patrones de ADN

Se puso a punto la coloración de eritrocitos de pollo (cuyo contenido de ADN fue determinado según literatura (Dhillon *et al.*, 1977;) en 2,8 pg por núcleo) y de células radiculares de *Allium cepa* (considerando a cada núcleo con 33,5 pg (Martínez y Ginzo, 1985). En nuestro caso hubiese sido más adecuado utilizar células con un contenido de ADN semejante a nuestro tejido como lo son los glóbulos rojos de pollo, pero debido a las diferencias de tratamientos necesarios para ambos tipos celulares, los resultados obtenidos con los núcleos de cebolla fueron más reproducibles y menos variables respecto a los referidos a eritrocitos de pollo.

2.3.6.2. Curva de hidrólisis

Otra de las variables a controlar fue el tiempo de hidrólisis, ya que si éste es escaso, medirá por defecto y si es prolongado también subestimarán los resultados debido a que se producen roturas y pérdidas del ADN. Se determinó entonces por medio de una curva de hidrólisis el tiempo óptimo de la misma y se decidió utilizar hidrólisis a 22 °C con HCl 5N durante 50 min.

2.4. Nucleolos

Los mismos fueron observados al microscopio en núcleos interfásicos por medio de la tinción con solución saturada de nitrato de plata. Para ello raíces fijadas y no pretratadas fueron aplastadas (previo tratamiento con pectinasa (ver 2.2.1.)) sobre portaobjetos con AcOH 45% y los cubreobjetos eliminados con CO₂, luego se agregó un gota de EtOH y se secaron al aire. Se incubaron entonces con solución al 100% de AgNO₃ a 60 °C en cámara húmeda como mínimo por 30 min hasta visualización del color marrón característico; luego se eliminaron los cubreobjetos con agua corriente y se observaron al microscopio. Se contó el número máximo de nucleolos.

3. Marcadores moleculares

3.1. Variación de los genes ribosomales

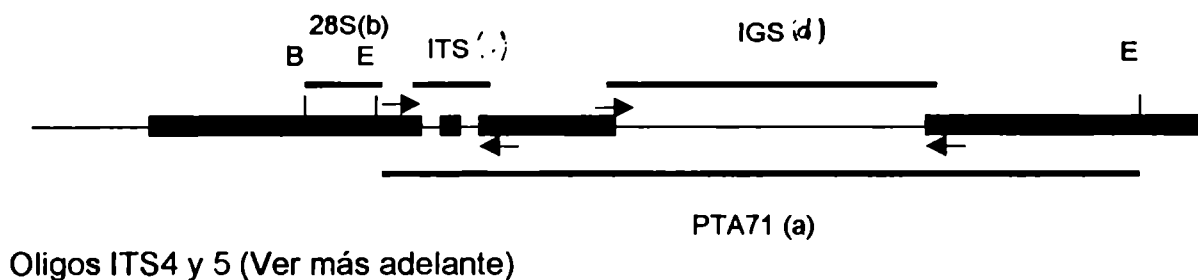
3.1.1. Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción

3.1.1.1. Sondas utilizadas

Se estudió la variación de la longitud de las subunidades de los genes ribosomales mediante la técnica de Southern blot. Para ello se emplearon 4 sondas:

- a) pTA71 (8,95 kpb), que corresponde a la subunidad completa de los genes ribosomales del genoma de trigo, (Gerlach *et al.*, 1979),
- b) el fragmento *Bam*HI-*Eco*RI del gen que codifica para la subunidad 25S de la sonda pTA71 [el mismo se obtuvo digiriendo el ADN del plásmido donde estaba clonada la subunidad completa (pTA71) conjuntamente con *Bam*HI y *Eco*RI y posterior separación de los fragmentos en gel de agarosa. La banda fue cortada y purificada mediante el sistema "gene clean®" (Bio 101, EUA), cuantificada y posteriormente marcada] y
- c) el fragmento que corresponde al espaciador intergénico interno (transcripto) de la subunidad o ITS (650 pb. aprox) de *S. chacoense* obtenido por amplificación mediante PCR (ver 3.1.2) y el fragmento que corresponde al IGS de *Oxalis tuberosa* (Tosto, en preparación) amplificado mediante PCR. (Fig. 7)

Fig. 7: Esquema de las sondas utilizadas: a: pTA71 de trigo longitud completa; b: fragmento *Bam*HI-*Eco*RI de la misma; c: fragmento que abarca al ITS1 y 2 y al gen 5,8S. Ubicación de los primers que se emplearon para su obtención y d: IGS de *O. tuberosa*. B y E: indican sitio de restricción *Bam*HI y *Eco*RI.



3.1.1.2. Extracción de ADN

La extracción de ADN fue realizada utilizando un método derivado de Sanghai-Marroof et al. (1984) (Hoisington et al., 1994 y Rogers y Bendich, 1985). El ADN se extrajo de hojas de plantas (cultivadas en macetas o "in vitro"); liofilizadas o frescas conservadas a -70 °C. En caso de liofilización, el tejido congelado fue sometido a secado en vacío en un liofilizador Labconco (EUA), durante 72 horas. En un tubo de polipropileno de 15ml se pesaron de 300 a 400 mg del tejido liofilizado molido en un molinillo ciclónico tipo Udy (Tecator Cyclotec, Suecia) al cual se agregaron 9 ml de solución de extracción CTAB (100mM Tris-HCl, pH7,5; 10mM EDTA, pH8; 700mM NaCl; 140mM 2-mecaptoetanol; 2% p/v bromuro de cetiltrimetil amonio; 1% PVP) a 65°C. Se homogenizó la muestra mediante inversiones suaves. A continuación se incubó durante 60 - 90 minutos a 65°C con movimiento continuo. Se agregaron posteriormente 4,5 ml de cloroformo:octanol (24:1) seguido de varias inversiones suaves de los tubos (1 a 2 minutos). La separación de la fase acuosa fue realizada después de centrifugar los tubos por 10 minutos en una centrífuga de mesa a 1300 xg y se la transvasó a nuevos tubos. Se repitió la extracción con cloroformo:octanol una segunda vez. El ARN de la muestra fue eliminado con el agregado de 50 µl de ARNasa (10 mg/ml) e incubado 30 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, el ADN fue precipitado con el agregado de 6 ml de isopropanol (2-propanol) a temperatura ambiente y el ADN rescatado con un capilar de vidrio en forma de gancho o bien precipitado por centrifugación. El ADN así obtenido fue resuspendido en 1 ml de TE 1X (10mM Tris-HCl, pH8; 1mM EDTA, pH8)

Adicionalmente, el ADN fue reprecipitado agregando 50 µl de NaCl 5M y 2,5 ml de etanol frío. Nuevamente se rescató el ADN precipitado utilizando un capilar de vidrio y después de lavarlo con etanol 70% fue resuspendido en 1 ml de TE 1X.

3.1.1.3. Determinación de la concentración de ADN

La concentración de ADN se cuantificó por medio de un fluorómetro (TKO 100 minifluorómetro, Hoefer Scientific Instruments, EUA) usando como agente

fluorescente al colorante de Hoechst 33258 (su estructura se intercala en el surco mayor de la doble hélice del ADN y fluoresce).

La concentración de ADN se ajustó a 0,25 µg/µl con el agregado de TE 1X. Las muestras de ADN así obtenidas fueron almacenadas a 4°C hasta su posterior utilización.

A su vez se verificó su integridad por medio de visualización después de electroforesis en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio.

3.1.1.4. Digestión, Separación de fragmentos y transferencia

Dado que el número de copias por genoma de estos genes es alto, se digirieron de 3 a 5 µg de ADN de cada una de las muestras con endonucleasas de restricción (3 u de enzima por µg de ADN) durante 3-4 hs en un volumen final de 100 µl y con el agregado de 0,01 mg/ml de BSA acetilada para asegurar una digestión completa. Las enzimas utilizadas fueron: *XbaI*, *EcoRV*, *BglII*, *DraI*, *EcoRI* y *BamHI* con sus buffers adecuados. Los ADNs digeridos fueron precipitados con 2 1/2 vol de EtOH y NaCl (2,5 M final), durante una noche a -20°C. Posteriormente se resuspendieron en 20 µl de H₂O bidestilada esterilizada y se sembraron con mezcla de siembra tradicional (azul de bromofenol -BPB- y xilen-cianol, según Maniatis *et al.*, 1989). Se corrieron electroforéticamente en geles de agarosa en porcentajes que oscilaron desde el 0,7 a 1% a 1,25 volts/cm en TAE 1X durante 17 hs aproximadamente. Los mismos se transfirieron a membranas de nylon mediante la técnica de "Southern blot" (Maniatis *et al.*, 1989) o por transferencia con vacío con solución SSC 10X.

La transferencia se realizó en una bandeja plástica con 2 l de buffer de transferencia (25mM NaPO₄, pH 6,5) en la cual se sumergió una esponja sobre la que se construyó el aparato de transferencia capilar. El mismo consistió en depositar sobre la esponja una hoja de papel secante grueso de 20 x 25 cm sobre la cual se depositó el gel boca abajo, seguido de una membrana de nylon junto con varias hojas de papel secante grueso (Sigma, catálogo: P4556), finalizando con una cantidad de toallas de papel secas (Valot, Argentina) formando un espesor de

10 a 15 cm. Cada una de las hojas de papel secante y la membrana de nylon fueron previamente remojadas en buffer de transferencia y se las ubicó cuidando que no quedaran burbujas de aire atrapadas entre el gel y el papel, que interrumpirían la capilaridad del sistema. Un peso de 1 kg dispuesto sobre una placa de acrílico para lograr una buena distribución, fue puesto en el tope de la pila de toallas. Se dejó proseguir la transferencia durante la noche (14-16hs).

Una vez finalizada la misma, se retiró la membrana y se la sometió a un lavado en 2X SSC (300mM NaCl; 30mM citrato de sodio; pH 7,4) durante 15 min. El ADN fue fijado mediante radiación UV utilizando un UV crosslinker (Stratagene, EEUU) a 120,000 $\mu\text{joules}/\text{cm}^2$ (5 min) y/o posterior horneado a 80°C, durante 2 horas, según los protocolos de los fabricantes de membranas (Hybond - Amersham, Inglaterra-, Nytran -Schleicher & Schuell, Alemania-, Magna Charge - Micron Separations, Inc, EUA).

3.1.1.5. Prehibridación, hibridación, lavados de astringencia y exposición

Se prehibridaron con **solución de PAES** y se hibridaron durante la noche con las sondas marcadas por el método de iniciadores al azar ("random primers") según las especificaciones de los fabricantes (Gibco-BRL, EUA; Pharmacia, Suecia y New England Byolabs, EUA)) con $\alpha^{32}\text{PdCTP}$ (New England Nuclear, EUA) y se eliminaron los nucleótidos radiactivos no incorporados mediante una columna de Sephadex G50 construida en el laboratorio; alternativamente se marcó mediante PCR con dig-UTP al 5% el fragmento correspondiente al ITS (ver 3.1.2 y 3.2). El principio de detección no radiactiva se basa en el marcado de la sonda con un antígeno (Digoxigenina, DIG, patentado por Boehringer Mannheim) que luego es detectado por un anticuerpo (Anti-DIG) que está unido covalentemente a un molécula de fosfatasa alcalina (AP) que al desfosforilar un sustrato fotolítico (AMPPD o CSPD; Tropix, EUA) emite luz a 470nm.

La sonda pegada inespecíficamente se eliminó con los siguientes lavados de astringencia:

2X SSC, 0,1% SDS	1x15 min a temp. amb
1X SSC, 0,1% SDS	1x 15 min a temp. amb
1X SSC, 0,1% SDS	1x15 min a 65°C.
0,2X SSC, 0,1% SDS	1x15 min a 65°C.

Luego se expusieron a -80°C con películas autoradiográficas Kodak X-Omat, (EUA) o similares y pantallas intensificadoras adecuadas durante tiempos variables, se revelaron en cuarto oscuro como se hace habitualmente y se evaluaron los resultados.

solución de PAES (polianetolsulfónico):	
SSPE	2,5X
SDS	1%
PAES	0,1%
Pirofosfato de sodio	0,01%

El siguiente cuadro resume los pasos realizados en la hibridación y posterior detección de la sonda cuando ésta era del tipo no radiactivo (marcada con DIG).

pasos	tiempo	temperatura	objetivo
hibridación	15-18 hs	65°C	pegado de sonda
lavado en 0,15 X SSC, 0,1% SDS	2 x 5 min.	temperatura ambiente	eliminación del excedente de sonda
lavado en 0,15 X SSC, 0,1% SDS	3 x 15 min.	65°C	eliminación de sonda pegada inespecíficamente
Enjuague en Buffer1 (10mM Tris-HCl pH 7,5; 150mM NaCl)	1 x 5 min.	temperatura ambiente	lavar SDS
Incubación en Buffer 2 (idem Buffer 1 + 0,1% de reactivo de bloqueo)	1 x 30 min.	temperatura ambiente	evitar pegado inespecífico de anticuerpo
Incubación en Anti-DIG (idem buffer 2 + 1:15000 anti-dig)	1 X 30 min.	temperatura ambiente	pegar anticuerpo
Lavado en Buffer 1	3 x 10 min.	temperatura ambiente	lavar exceso de anticuerpo

Lavado en Buffer 3 (10mM Tris-HCl pH 9,5; 100mM NaCl; 50mM MgCl ₂)	1x 5 min.	temperatura ambiente	equilibrar la membra- na a pH adecuado para la acción de la AP
Incubación en sustrato quimioluminiscente (idem buffer 3 + 15ul/ml de AMPPD)	1 x 20 min.	temperatura ambiente	

La exposición se realizó con películas autorradiográficas durante 15-18 hs (durante la noche) a temperatura ambiente. Ocasionalmente, se incubó previamente a 37°C por 1-2 hs para incrementar la actividad inicial de la enzima. Las películas se revelaron y fijaron utilizando reactivos Kodak GBX (EUA).

3.1.1.6. Reutilización de membranas

Las sondas fueron despegadas de las membranas incubando las mismas con agitación en una solución de SSC 0,1X; SDS 0,1% a 100°C y dejándola enfriar a temperatura ambiente, permitiendo 6 reusos en promedio.

3.1.1.7. Cálculo de los pesos moleculares (PM)

El peso molecular de las bandas se calculó mediante comparación de la migración relativa con los marcadores de PM que se emplearon en cada corrida electroforética (en general se utilizó al fago λ digerido con la endonucleasa de restricción *Hind*III). Los mismos se hibridaron con marcador λ radiactivo para poder detectarlos en la película autorradiográfica. En todos los casos se midieron las distancias de migración de las bandas de PM conocidos y por interpolación de las distancias de las bandas incógnitas se estimaron sus tamaños. Se calcularon por medio del método de los recíprocos (Elder y Southern, 1987), mediante un programa de computación creado en el laboratorio (Dr. Dubcovsky).

3.1.2. Polimorfismos de los ITS mediante PCR

Los ITS fueron amplificados a partir de ADN total de los individuos analizados. Estas secuencias habían sido descritas para la amplificación de ITS de hongos (White *et al.* 1990). Las mismas fueron comparadas con las secuencias de los genes ribosomales de tomate (Kiss *et al.*, 1989), trigo y según ello fue necesario modificar dos bases (se resaltan en negrita), evidenciando de esta manera el alto grado de conservación de estas regiones flanqueantes en todos estos organismos.

La secuencia de los iniciadores son:

ITS4 5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3'
 ITS5 5' GGAAGG**G**AAGTCGTAACAAGG 3'

Las condiciones de reacción fueron las siguientes:

Buffer libre de Mg ²⁺	1x
MgCl ₂	1,5mM
dNTPs (c/u)	200 µM
ITS4 e ITS5 (c/u)	0,1 µM
Taq ADNpol	1,25 u
ADN templado	50 ng
volumen final	50 µl

Se cubrieron las mezclas con 1 gota de aceite mineral.

Los ciclos de amplificación se ejecutaron en un ciclador Perkin Elmer modelo 480 y fueron los siguientes:

94°C	1 min	1 ciclo
94°C	30 seg	40 ciclos
50°C	1 min	
72°C	2 min	
72°C	5 min	1 ciclo

Los productos de amplificación se corrieron electroforéticamente en geles de agarosa al 1,6 % con bromuro de etidio, en TAE 1X, se visualizaron con luz UV y se fotografiaron. Los PM se calcularon como en 3.1.1.

3.2. Variación de otros fragmentos genómicos mediante RFLP

3.2.1. Sondas utilizadas

Se utilizaron secuencias genómicas de bajo número de copias de la biblioteca genómica de tomate del laboratorio del Dr Tanskley. (*Solanum* y *Lycopersicon* presentan gran homología (Bonierbale *et al.*, 1988; Gerbhardt *et al.*, 1991)) clonadas en los plásmidos de *E.coli* PBR322 o PUC19 gentilmente cedidas por el Dr.Tanskley (Univ. Cornell, EUA). (Fig. 8 y Tabla 4).

Fig.8: Esquema de los cromosomas y ubicación de las sondas utilizadas. Con flechas se indican la posición de la sonda en el mapa de tomate. Los cuadrados indican la posición aproximada del centrómero.

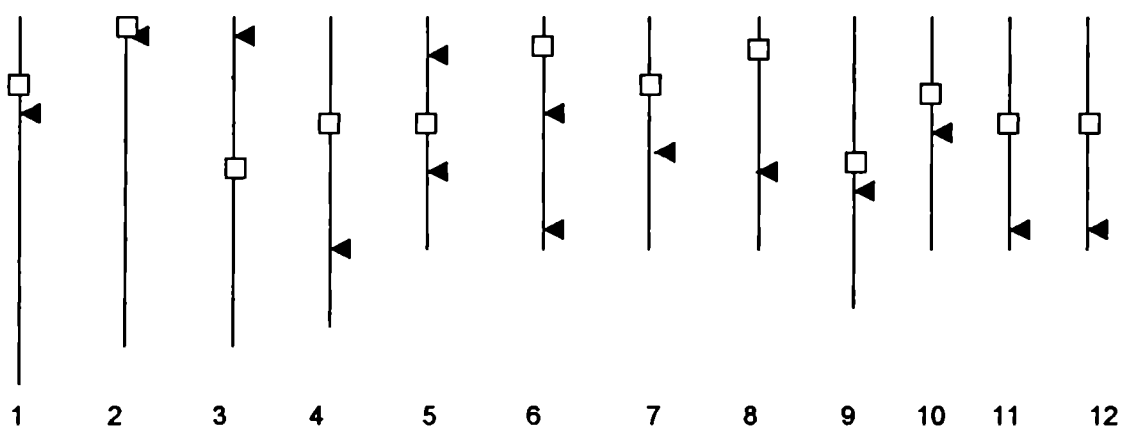


Tabla 4: Nombres de las sondas utilizadas y su ubicación en los cromosomas.

Cromosoma Nro	Sonda
1	TG245
2	TG 480
3	TG479
4	TG574
5	TG441-TG419
6	TG444-TG482
7	TG183
8	TG510
9	TG404
10	TG408
11	TG393
12	TG473

Los plásmidos recombinantes fueron amplificados en bacterias previa transformación (Hoisington *et al.* 1994) de la cepa bacteriana DH5 α con 8 ng de los plásmidos, utilizando ampicilina como agente selectivo (Maniatis *et al.*, 1989). Una vez obtenidas colonias aisladas, se extrajeron los plásmidos con el siguiente protocolo:

- a) se repicó cada una de las colonias y se las resuspendió en un tubo Eppendorff con 50 μ l de **solución de lisis**.
- b) se incubaron los tubos a 100°C durante 5 min.
- c) se centrifugaron a 4°C a 6000 xg y se guardaron a -20°C hasta su utilización.

Para evaluar el tamaño de los fragmentos que se utilizaron como sondas se amplificaron los productos de las lisis anteriores mediante PCR. Como iniciadores se utilizaron oligonucleótidos que poseen homología con las regiones de los sitios múltiples de clonado en los plásmidos vectores y que flanquean los insertos de tomate, con las siguientes secuencias:

CV72 5' ACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGT 3'
 CV76 5' AACAGCTATGACCATGATTACGCC 3'

Las condiciones de amplificación fueron las siguientes:

Buffer de PCR libre de Mg ²⁺	1x
MgCl ₂	1,5 mM
dNTPs (c/u)	50 μ M
iniciador CV72	0,2 μ M
iniciador CV76	0,2 μ M
Taq. pol.	0,5 u
ADN templado (producto de lisis)	2,5 μ l
volumen final	25 μ l

Se cubrieron mezclas con 1 gota de aceite mineral.

Los ciclos de amplificación se ejecutaron en un ciclador Perkin Elmer modelo 480 y fueron los siguientes:

94°C	1 min	1 ciclo
94°C	1 min	35 ciclos
55°C	2 min	
72°C	2 min	
72°C	5 min	1 ciclo

solución de lisis

Tris-ClH pH 8,5	2 mM
EDTA pH 8,5	20 mM
Tritón X-100	1%

esterilizada por filtración a través de filtros de 0,2 μ .

3.2.2. Extracción de ADN y cuantificación

El ADN se extrajo y cuantificó como se mencionó en 3.1.1.2.

3.2.3. Digestión, separación de fragmentos y transferencia

Dado que los *loci* que se evaluaron son de secuencia única o de bajo número de copias, fue necesario digerir al menos 10 μ g de ADN de cada una de las muestras con enzimas de restricción (3 u de enzima por μ g de ADN) durante 3-4 hs en un volumen final de 200 μ l y con el agregado de 0,01 mg/ml de BSA acetilada para asegurar una digestión completa; las digestiones fueron precipitadas con 2 1/2 vol de EtOH y 2,5 M final de NaCl durante una noche a -20°C. Posteriormente se resuspendieron en 20 μ l de H₂O bidestilada y esterilizada y se sembraron con mezcla de siembra tradicional (azul de bromofenol -BPB- y xilen-cianol, según Maniatis *et al.*, 1989). Se corrieron electroforéticamente en geles de agarosa 0,8% a 15 mA en TAE 1X durante 17 hs aproximadamente. Los mismos se transfirieron a membranas de nylon mediante la técnica de "Southern blot" o por transferencia con vacío con buffer fosfato 25 mM pH 6,5 y se fijaron como en 3.1.1.3.

3.2.4. Prehibridación, marcación, hibridación, detección, lavados de as-tringencia y exposición

Se prehibridaron con **solución de PAES** (ver 3.1.1.4.) y/o **solución de hibridación** (3 hs como mínimo) (CIMMyT) y se hibridaron, con las sondas marcadas no radiactivamente, durante la noche a 65°C en tubos de borosilicato con rotación continua.

Marcación no radiactiva:

Se llevó a cabo mediante PCR como en 3.2.1. pero en un volumen de 100 µl y con el agregado de dig dUTP (Boehringer Mannheim, Alemania) al 5% como se indica a continuación:

Buffer de PCR libre de Mg ²⁺	1x
MgCl ₂	1,5 mM
dATP, dCTP, dGTP(c/u)	50 µM
dTTP	47,5 µM
Dig. dUTP	2,5 µM
iniciador CV72	0,2 µM
iniciador CV76	0,2 µM
Taq. pol.	0,5 u
ADN templado (producto de lisis)	5 µl
volumen final	100 µl

Se cubrieron las mezclas con 1 gota de aceite mineral.

Los ciclos de amplificación fueron los mismos que se describieron en 3.2.1.

Una vez amplificados los insertos, se extrajo el aceite mineral agregando a cada muestra 25 µl de TE y 50 µl cloroformo. Se agitaron, centrifugaron y se extrajeron las fases acuosas superiores.

Para controlar la incorporación y el tamaño de los fragmentos amplificados, se corrió electroforéticamente 1 µl de c/u de las reacciones de PCR en un gel de agarosa al 1% (con EtBr) en TAE 1X. Se fotografió el gel, se calcularon los PM de los fragmentos y se transfirió a membranas de nylon por el método del "squash blot", que consiste en aplastar el gel contra la membrana con solución de transferencia. Luego esta última fue fijada como en 3.1.1.3. y tratada con el sistema de detección de digoxigenina que se detalla posteriormente. En el caso de que se

amplificara más de una banda, se cortaba la banda correcta de un gel de agarosa preparativo, y luego se utilizaba como sonda. No fue necesario utilizar agarosa de bajo punto de fusión.

Una vez hibridizadas las membranas se lavaron con las siguientes condiciones de astringencia:

0,15X SSC, 0,1% SDS	2 x 5 min a temp. amb.
0,15X SSC, 0,1% SDS	3 x 15 min a 65°C

Detección de la digoxigenina:

- 1) Se lavaron las membranas en **solución 1**.
- 2) Se incubaron 30 min en **solución 2**.
- 3) Se incubaron 30 min en **solución de anticuerpo anti-Dig**.
- 4) Se lavaron 3x10 min con **solución 2**.
- 5) Se lavaron 3x10 min con **solución 1**.
- 6) Se lavaron 1x10 min con **solución 3**.
- 7) Se incubaron en **solución de AMPPD** (Tropix, EUA) durante 20 min.
- 8) Se expusieron a 37°C con películas autoradiográficas Kodak X-Omat o similares durante 15hs-18hs y se revelaron en cuarto oscuro como de costumbre (Marnatis *et al.*, 1989).

Soluciones y reactivos:

solución 1	
Tris-ClH	0,01 M pH7.5
NaCl	0,15 M
solución 2	
Tris-ClH	0,01 M pH7.5
NaCl	0,15 M
Bloqueante	0,2%
solución 3	
Tris-ClH	0,01 M pH 9,5
NaCl	0,10 M
MgCl ₂	0,05 M

solución de anticuerpo anti-Dig:

solución 2 + 1 µl/15 ml de solución

Anti-digoxigenina-AP, Boehringer Mannheim, Alemania 150 u /200 µl. Estos anticuerpos (fragmentos Fab policlonales de oveja) están acoplados a fosfatasa alcalina que reacciona con el sustrato quimioluminiscente AMPPD.

solución de AMPPD: solución 3 + 2-10 μ l AMPPD (10 mg/ml)

solución de hibridización	
SSC	5X
Laurilsarcosina	0,01%
SDS	0,02%
Bloqueante (BoehringerMannheim)	0,2%

3.2.4. Detección de las sondas marcadas

Las sondas marcadas transferidas a las membranas fueron detectadas como en 3.2.3. pero todas las incubaciones se redujeron a la mitad y un solo lavado de cada uno de ellos. Se expusieron a 37°C con películas autoradiográficas X-Omat o similares durante 1hs-2hs y las películas se revelaron en cuarto oscuro como de costumbre.

3.2.5. Reutilización de membranas

Las sondas fueron despegadas de las membranas incubando las mismas con agitación en una solución de SSC 0,1X, SDS 0,1% a 100°C y dejándola enfriar a temperatura ambiente, permitiendo 6 reusos en promedio. Para disminuir el arrastre de sonda pegada en forma definitiva, fue necesario evitar que las membranas se sequen y repetir la incubación con la solución de lavado recién mencionada.

3.3. Análisis de los genomas mediante AFLP

3.3.1. Generación de AFLP

La generación de AFLP se realizó básicamente como en Milbourne *et al.* (1997) y en Vos *et al.* (1995), con las modificaciones pertinentes para la utilización de tinción con plata en lugar de utilización de radiactivo (Marcucci Poltri *et al.*, 1996).

Para la obtención de los fragmentos de AFLP se digirieron los ADNs de todos los individuos con dos enzimas de restricción simultáneamente:

EcoRI, de corte poco frecuente y *MseI* con alta frecuencia de corte. La digestión se realizó a 37°C durante 4 hs. en un buffer compatible para las dos enzimas y también para la ligación que ocurre *a posteriori*.

Digestión: 50 µl de reacción

0,5 µg de ADN
Buffer RL 1x (10 mM Tris-HAc pH 7.5, 10 mM MgAc, 50 mM KAc, 5mM DTT, 50 ng/µl BSA)
EcoRI 2,5 u
MseI 2,5 u

Ligación de los adaptadores:

A los productos obtenidos de la digestión enzimática se le agregaron 10 µl de la siguiente mezcla de ligación:

10 mM Tris-HAc pH 7.5, 10mM MgAc, 50 mM KAc, 5mM DTT, 50 ng-µl BSA conteniendo 5 pmol de adaptadores *EcoRI*, 50 pmol de adaptadores *MseI*, 1 u T4 DNA ligasa (Gibco-BRL, EUA) y 12 pmol ATP.

Adaptadores:

adaptador para los sitios *EcoRI*:

5'CTCGTAGACTGCGTACC 3'
3' CTGACGCATGGTTAA 5'

Adaptador para los sitios *MseI*:

5' GACGATGAGTCCTTGAG
3' TACTCAGGAACTCAT 5'

PCR no selectiva o preamplificación:

Una vez producida la ligación de los adaptadores, se realizó la primera PCR no selectiva con primers +1 (E01= 5'GACTGCGTACCAATTCA 3', M01=5'GATGAGTCCTTGAGTAAA 3') en las siguientes condiciones

25 µl volumen final con

4ul del templado (producto de restricción/ligación),
 75 ng de primers E01 y M01
 0,2 mM dNTPs
 1 u de Ampli Taq LD (Perkin Elmer, EUA)
 1x buffer PCR,
 1,5 mM MgCl₂

La PCR se llevó a cabo en un ciclador térmico Perkin Elmer 480 (EUA) con los siguientes ciclos:

(94°C 30 seg, 60°C 30 seg y 72°C 1 min) por 30 ciclos.

Estos productos fueron controlados en agarosa y guardados a 0°C hasta su utilización.

PCR selectiva:

Para adaptar la técnica al método de tinción con plata (en lugar de marcar con radiactivo el primer), fue necesario utilizar el triple de cantidad del templado (producto de pre-amplificación) que se usa habitualmente para radiactivo, ya que menores cantidades no produjeron producto visible.

en un volumen final de 20 µl.

1-2 µl de producto de preamplificación,
 30 ng of cada primer selectivo +3,
 0,2 mM dNTPs,
 1x buffer PCR,
 1,5 mM MgCl₂,
 0,5 u Amplitaq DNA polimerasa (Perkin Elmer, EUA),

Las condiciones de amplificación fueron las mismas que en Vos *et al.* (1995) pero se llevaron a cabo en una máquina de PCR Perkin Elmer 480.

94°C	30 seg	
65°C	30 seg	1 ciclo
72°C	30 seg	
94°C	30 seg	
64°C	30 seg	1 ciclo
72°C	30 seg	
Reducción de 1°C por ciclo hasta llegar a 56°C		
94°C	30 seg	
56°C	30 seg	25 ciclos
72°C	30 seg	

Oligos utilizados:

E31:AAA	M31:AAA
E32:AAC	M32:AAC
E38:ACT	M42:AGT
E43:ATA	M37:ACG

3.3.2. Separación y detección de AFLPs

Los productos de amplificación fueron guardados a -20°C hasta ser corridos electroforéticamente. Antes de sembrar las muestras (20 μl), se les agregaron 10 μl de buffer de carga con ambos colorantes (azul de bromofenol y xileno cianol, con formamida 98%), se calentaron a ebullición durante 3 a 5 min e inmediatamente se enfriaron en hielo. Luego se corrieron en geles desnaturalizantes de poliacrilamida al 6% en buffer TBE 1x, durante 3- 4 hs a 45 W constantes en el sistema de Gibco-BRL Modelo S2 (EUA). Una vez finalizada la corrida electroforética se utilizó el sistema de Promega Biotech (EUA) "DNA staining kit" para tinción de geles de secuencia con nitrato de plata. Brevemente consiste en:

- 1) fijación del gel en ácido acético al 10% durante 20 min
- 2) 3 lavados en agua bidestilada durante 2 min cada vez
- 3) tinción con nitrato de plata al 0,1% y formaldehído 1,5 ml/litro de solución
- 4) lavado de 10 seg en agua bidestilada fría
- 5) revelado en solución de carbonato de sodio 30 g/l, formaldehído 1,5 ml/litro y tiosulfato de sodio 1 mg/l hasta obtener coloración en las bandas
- 6) detención de la reacción con ácido acético al 10% durante 2 min.
- 7) 2 lavados con agua bidestilada durante 2 min cada vez.
- 8) secado en horno a 65°C hasta que no esté pegajoso.

Los patrones de bandas se analizaron directamente en los vidrios sobre un transiluminador de luz blanca o bien los geles fueron despegados de los vidrios con hidróxido de sodio 0,2 N durante tiempos variables y levantados con papel

Wattman 3MM (Inglaterra), secados al vacío a 80°C y conservados para su análisis.

3.4. Análisis de los genomas mediante SSR o Microsatélites

3.4.1. Generación de SSR

La utilización de los microsatélites, se realizó básicamente como en Milbourne *et al.* (1997), Provan *et al.* (1996 a y b) con las modificaciones pertinentes para la utilización de tinción con plata en lugar de utilización de radiactivo (Manifesto *et al.*, 1997).

Se utilizaron los siguientes "primers", no publicados aún, cuyas mezclas fueron gentilmente cedidas por Robbie Waugh (SCRI) para su utilización.

Oligonucleótidos SO	Temp. de apareamiento °C
SO 24	51
SO 06	53
SO 09	53
SO 10	49
SO 11	47
SO 26	53
SO 15	53

Los ciclos de amplificación fueron los siguientes: Con las temperaturas de apareamiento correspondientes a cada uno.

94°C	1 min	1 ciclo
94°C	1 min	35 ciclos
°C	1 min	
72°C	1 min	
72°C	5 min	1 ciclo

Los productos de amplificación se corrieron en geles de alta resolución de poliacrilamida, teñidos con nitrato de plata como en (Manifesto *et al.*, 1997).

4. Análisis de los datos

Se utilizaron los programas Excel 7.0, Statistica v. 4.1 y NTSys pc.

4.1. Generación de la matriz básica de datos

Un fragmento de restricción (RFLP), de restricción y amplificación (AFLP) o de amplificación (microsatélite), que posee una movilidad electroforética determinada, (sin tener en cuenta su intensidad) puede estar (o no) presente en cada uno de los individuos estudiados y esta propiedad permitió que sea codificado con 1 y 0 según su presencia o ausencia en c/u de ellos. Con estos datos se construyeron las matrices básicas, una para cada grupo de datos: AFLP, RFLP y microsatélites evaluados: La Matriz Básica de Datos (MBD) representó a todos los individuos y a sus respectivas variables. Las filas correspondieron a las OTUs (unidades taxonómicas operativas, -cada una es un individuo distinto) y las columnas a las variables (cada fragmento de restricción o amplificación). En caso de datos dudosos o bien perdidos se les asignó un código arbitrario de 5. Fig. 9.

4.2. Generación de la matriz de similitud

Cada MBD se analizó con el programa NTSYS-PC (versión 1.80) (Rohlf, 1992). Se construyó primero una matriz de similitud, utilizando como coeficiente de similitud al de Jaccard (1908), que contempla la igualdad de entidades únicamente por las presencias compartidas. (Dudley, 1994). Cuando se utilizó la matriz de distancia, ésta se calculó como la complementaria de la de similitud, es decir

$$\text{Dist}=1-\text{sim}$$

Similitud entre las OTUs I-K

$$J_{I-K}=a/n-d$$

a =nro de bandas compartidas entre el Individuo I y K

n=nro de bandas totales (compartidas y no compartidas) entre I y K.

d =nro de ausencias compartidasD

Una vez generada la matriz de similitud entre todos los pares de OTUs, se construyó un dendrograma para simplificar su visualización.

4.2.1. Correlaciones entre matrices

Para ver si los marcadores reflejaban el mismo vínculo entre las OTUs se realizó un test de correlación entre las matrices de similitud generadas por los tres métodos utilizados (Milbourne *et al.*, 1997). Se analizaron las significancias de las correlaciones mediante ANOVA utilizando el programa Statistica v 4.1.

4.2.2. Prueba de la diferencia entre dos coeficientes de correlación

Los valores de r se convirtieron en una función de z, según la fórmula desarrollada por Fisher.

$$Z = \frac{1}{2} * \ln \left(\frac{1+r}{1-r} \right)$$

Las diferencias entre dos coeficientes se probaron, con el estadístico

$$t = \frac{(z_1 - z_2)}{\sqrt{\left(\frac{1}{n_1 - 3} \right) + \left(\frac{1}{n_2 - 3} \right)}}$$

y su significancia se observó en una tabla de $t(\alpha, \infty)$.

4.3. Generación del dendrograma

Con el objeto de visualizar fácilmente las similitudes entre los individuos, se construyeron los dendrogramas a partir de las matrices de similitud. Se utilizaron dos métodos de ligamiento que se detallan a continuación. La distorsión de los mismos se reflejó mediante el coeficiente de correlación cofenético. A partir del árbol generado se construyó una matriz cofenética, que refleja las similitudes entre los individuos, pero como se observa a partir del dendrograma. Esta nueva matriz junto con la de similitud, fueron correlacionadas (ver apartado anterior 4.2.1), reflejando dicho coeficiente el grado de distorsión debido al ligamiento.

4.3.1. Ligamiento mediante UPGMA

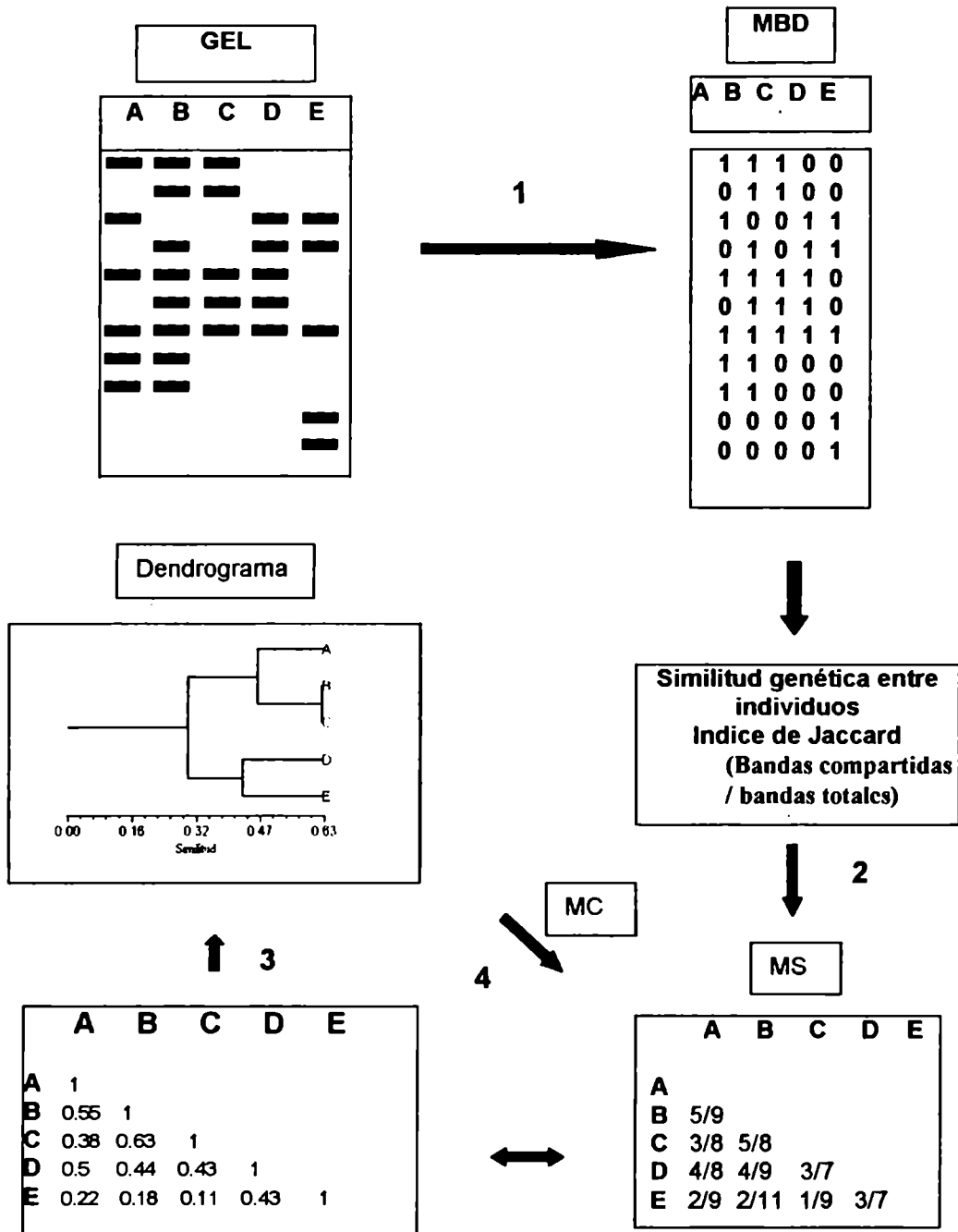
Con estos datos se construyó un dendrograma utilizando el método de agrupamiento denominado SAHN, que agrupa en forma jerárquica y secuencial a los individuos según las similitudes. Para el ligamiento se empleó el método denominado UPGMA Sneath y Sokal (1963), que es el promedio aritmético no ponderado de las similitudes (o ligamiento promedio), por ofrecer este método una menor distorsión del dendrograma.

Para determinar la distorsión que se produce al construir el dendrograma se calculó una matriz cofenética a partir del mismo. Esta se correlacionó con la matriz de similitud y se calculó el coeficiente de correlación entre ambas.

4.3.2. Ligamiento mediante Neighbor joining

A partir de cada matriz de similitud (generada con cada técnica) se construyó una matriz de distancia, con los datos complementarios a los de similitud obtenidos con el índice de Jaccard, mediante la subrutina "transformación" del programa NTSys v1.8. Luego se graficaron los distintos dendrogramas utilizando el método de Neighbor joining (Saitou y Nei (1987) y para enraizarlo se utilizó el grupo externo *tomate*.

Fig.9 : Esquema de los pasos seguidos para la evaluación de los datos. 1) Construcción de la MBD a partir de las autorradiografías y/o geles 2) Construcción de la matriz de similitud utilizando el coeficiente de Jaccard 3) Representación de las relaciones entre especies por medio de un dendrograma 4) Medición de la distorsión del fenograma: Construcción de una matriz de similitud a partir del fenograma obtenido (MC) y comparación de la misma con la matriz de similitud obtenida a partir de la MBD.



RESULTADOS

1. Caracterización fenotípica del germoplasma analizado

El objetivo de esta tesis es la caracterización de la variabilidad genética en una muestra representativa del germoplasma de *Solanum*. Con el objeto de constatar si la muestra también es representativa de la variabilidad presente en el germoplasma para caracteres de interés agronómico se recopiló y ordenó la información preexistente proveniente de la base de datos del banco de germoplasma de Sturgeon Bay (Bamberg *et al*, 1996 y sitio web www.ars-grin.gov). Los caracteres seleccionados para la descripción de genotipos fueron los siguientes:

Resistencia a enfermedades bacterianas (*Pseudomonas* y *Corynebacterium*)

- Resistencia al ataque de insectos.
- Resistencia a estreses.
- Resistencia a enfermedades fúngicas
- Resistencia a virosis

Los datos recopilados del banco de germoplasma se ordenaron en la Tabla 5. Lamentablemente, no todas las entradas fueron evaluadas para todos los caracteres, impidiendo un análisis completo del material en estudio.

- Resistencia a enfermedades bacterianas:

Se evaluó al menos una entrada de cada especie para resistencia a *Pseudomonas solanacearum*, y todas fueron susceptibles. En cuanto a resistencia a *Corynebacterium sepedonicum* ("Ring rot"), las entradas de *S. chacoense* mostraron genotipos susceptibles y resistentes. Otros genotipos resistentes fueron: 3 entradas de *S. oplocense*, una entrada de *S. gourlayi* y una de *S. kurtzianum*.

- Resistencia al ataque de insectos:

S. chacoense presentó altísima variabilidad en cuanto a resistencia al escarabajo colorado de la papa (CPB), presentando una misma entrada, distintos fenotipos. Se observó también resistencia a este insecto en una entrada

de *S. spgazzinni*, en tres de *S. tarijense* y resistencia media en una entrada de *S. commersonii*; en cambio, se observó gran susceptibilidad en las entradas de *S. kurtzianum*. Respecto a la resistencia al áfido de la papa, ésta fue mediana en *S. infundibulliforme*, en una entrada de *S. megistacrolobum*, y en dos entradas de *S. tarijense*. Se observó variabilidad en la resistencia al escarabajo pulgoso, ("flea beetle") en *S. chacoense* (genotipos susceptibles, mediana y alta resistencia).

- Resistencia a estreses:

S. megistacrolobum y *S. vernei* resultaron resistentes a heladas, y una entrada de *S. oplocense* evidenció moderada resistencia al calor.

- Resistencia a enfermedades fúngicas:

Las evaluaciones de resistencia a *Verticillium spp* fueron muy variables dentro de las especies, y aún dentro de entradas, en experimentos llevados a cabo en distintas fechas, como por ej, *S. chacoense* Oka 4810, *S. commersonii* Oka 7292, *S. kurtzianum* Oka 4971, *S. oplocense* Oka 3964 y 5478.

- Resistencia a virosis:

Similares variaciones se observaron también en las resistencias para PLRV, aunque no se observaron tantas variaciones dentro de una misma entrada.

Del análisis de datos morfológicos y agronómicos puede concluirse que existe variabilidad genética para varios de los caracteres analizados confirmando que el germoplasma es una fuente interesante para la búsqueda y caracterización de este tipo de caracteres y que en la muestra analizada en esta tesis existe una buena representación de esta variabilidad.

Tabla 5b: Códigos utilizados para la descripción de los caracteres fenotípicos evaluados en la Tabla 5a.

Códigos utilizados

1	BWILT: POTATO.BACT.SEQUE.86 <i>Pseudomonas solanacearum</i>	27	VERTWILT: IR1-POTATO <i>Verticillium spp</i>
2	EBLIGHT: POTATO.ERBL.CORSI.86 <i>Macrosporium/Alternaria solani</i>	28	VERTWILT: POTATO.VERT.ANDER.83 <i>Verticillium spp</i>
3	FROST: IR1-POTATO	29	VERTWILT: POTATO.VERT.ANDER.84 <i>Verticillium spp</i>
4	FROST: POTATO.FROST.BAMB.92	30	VERTWILT: POTATO.VERT.CORSI.83 <i>Verticillium spp</i>
5	HEAT: POTATO.HD.EWING.85	31	VERTWILT: POTATO.VERT.CORSI.84 <i>Verticillium spp</i>
6	RS: POTATO.RHIZ.CARLI.89 <i>Rhizoctonia solani.</i>	32	VERTWILT: POTATO.VERT.YOUNG.84 <i>Verticillium spp</i>
7	PSHED: POTATO.PSHED.BAMB.92	33	FLEABEETLE: POTATO.PEST.RADCL.85 <i>Flea Beetle</i>
8	PSTAIN: POTATO.PSTAIN.BAM.92	34	GPAPHID: IR1-POTATO <i>Myzus persicae</i>
9	TUBER: POTATO.TUBER.BAMB.92	35	MCNEM: POTATO.CHITW.HAFE.86 <i>Meloidogyne chitwoodi Nematode</i>
10	CPB: IR1-POTATO <i>Colorado Potato Beetle</i>	36	MCNEM: POTATO.CHITW.SASS.86 <i>Meloidogyne chitwoodi Nematode</i>
11	CPB: POTATO.CPB.CARTER.85 <i>Colorado Potato Beetle</i>	37	MHNEM: POTATO.HAPLA.HAFE.86 <i>Meloidogyne hapla Nematode</i>
12	CPB: POTATO.CPB.RADCLI.84 <i>Colorado Potato Beetle</i>	38	MHNEM: POTATO.HAPLA.RIED.87 <i>Meloidogyne hapla Nematode</i>
13	CPB: POTATO.CPB.SANFOR.84 <i>Colorado Potato Beetle</i>	39	MHNEM: POTATO.HAPLA.SASS.86 <i>Meloidogyne hapla Nematode</i>
14	CPB: POTATO.CPB.SANFOR.84 <i>Colorado Potato Beetle</i>	40	PLRV: IR1-POTATO
15	CPB: POTATO.CPB.SHERRO.84 <i>Colorado Potato Beetle</i>	41	PLRV: POTATO.PLRV.BANTT.83
16	CPB: POTATO.CPB.TINGEY.84 <i>Colorado Potato Beetle</i>	42	PLRV: POTATO.PLRV.BANTT.84
17	PVM: IR1-POTATO	43	PLRV: POTATO.PLRV.BISHO.84
18	EBN: IR1-POTATO	44	PLRV: POTATO.PLRV.MANZE.84
19	FLOWR: POTATO.FLOWR.BAMB.95	45	PLRV: POTATO.PLRV.THOMA.84
20	FLOWR: POTATO.FLOWR.BAMB.96	46	WART: IR1-POTATO <i>Synchytrium endobioticum</i>
21	FLOWR: POTATO.FLOWR.BAMB.97	47	BLACKLEG: POTATO.BACT.KELMA <i>Erwinia caratovora</i>
22	LHOP: POTATO.PEST.RADCL.85 <i>Empoasca fabae</i>	48	BLACKLEG: POTATO.BACT.KELMA.88 <i>Erwinia caratovora</i>
23	PAPHID: IR1-POTATO <i>Macrosiphum euphorbiae</i>	49	BWILT: IR1-POTATO <i>Pseudomonas solanacearum</i>
24	PAPHID: POTATO.PEST.RADCL.85 <i>Macrosiphum euphorbiae</i>	50	LBLIGHT: IR1-POTATO <i>Phytophthora infestans</i>
25	RINGROT: IR1-POTATO <i>Corynebacterium sepedonicum</i>	51	TARNISH: POTATO.PEST.RADCL.85 <i>Tarnish Beetle</i>
26	RINGROT: POTATO.BACT.SLACK.86 <i>Corynebacterium sepedonicum</i>		

Tabla 5c: Códigos utilizados para los resultados de las evaluaciones biológicas de la tabla 5a.

Resistencias		Liberación de polen y producción de flores		Producción de tubérculos		Tinción del polen	
Código	Definición	Código	Definición	Código	Definición	Código	Definición
H	Hipersensible	0	Ninguna	0	Ninguna	0	0% tinción
I	Inmune	1	Muy poca	1	Poca	1	1 - 20%
M	Medio	2	Poca	2	Mediana	2	21 - 40%
R	Resistente	3	Mediana	3	Alta	3	41 - 60%
S	Susceptible	4	Alta	4	Muy alta	4	61 - 80%
T	Tolerante	5	Muy alta			5	81 - 100%
MR	Muy Resistente						
MS	Muy Susceptible						

Códigos de Enfermedades				
Bacterianas	Fúngicas	Virales	Insectos	Nematodos
1-25-26-27a32-47-48	2-51	17-40a45-	10*16-33-34-22a24-52	35a39
Códigos de Stresses				
Frío=3-4		Calor=5		
Códigos de Morfología				
Flores=19*21		Polen=7-8		
Códigos de Producción				
Tuberización=9				

2. Caracterización cariotípica

2.1. Descripción de los cariotipos

Como se mencionó en la introducción, el grupo de especies silvestres analizadas en este trabajo no cuenta hasta el momento con la descripción de sus cariotipos (morfología, tamaño, presencia de constricciones secundarias o número de nucleolos). Dada la complejidad de la observación microscópica, en este trabajo concentró el estudio en los citotipos diploides con técnicas numéricas. En los citotipos tetraploides y hexaploides el análisis se limitó a realizar los recuentos cromosómicos. Los distintos citotipos analizados y el resultado de los recuentos cromosómicos se detallan en la Tabla 6.

El grupo en estudio cuenta con citotipos de $2n=24$, $2n=48$ y $2n=72$ cromosomas, para diploides, tetraploides y hexaploides respectivamente (Fig. 10). Ocasionalmente se observaron aneuploidías, fenómeno descrito como extremadamente raro en poblaciones naturales de este género (Wilkinson, 1994).

Fig. 10: Placas metafásicas de distintas especies de *Solanum*. A: *S. microdontum* ssp *microdontum* Oka 7634 ($2n=24$); B: *S. oplocense* Oka 7592 ($2n=24$); C: *S. commersonii* ssp *malmeanum* (Oka 7313) ($2n=24$) y D: *S. gourlayi* (Oka 7626) ($2n=48$). Las flechas indican la constricción secundaria.

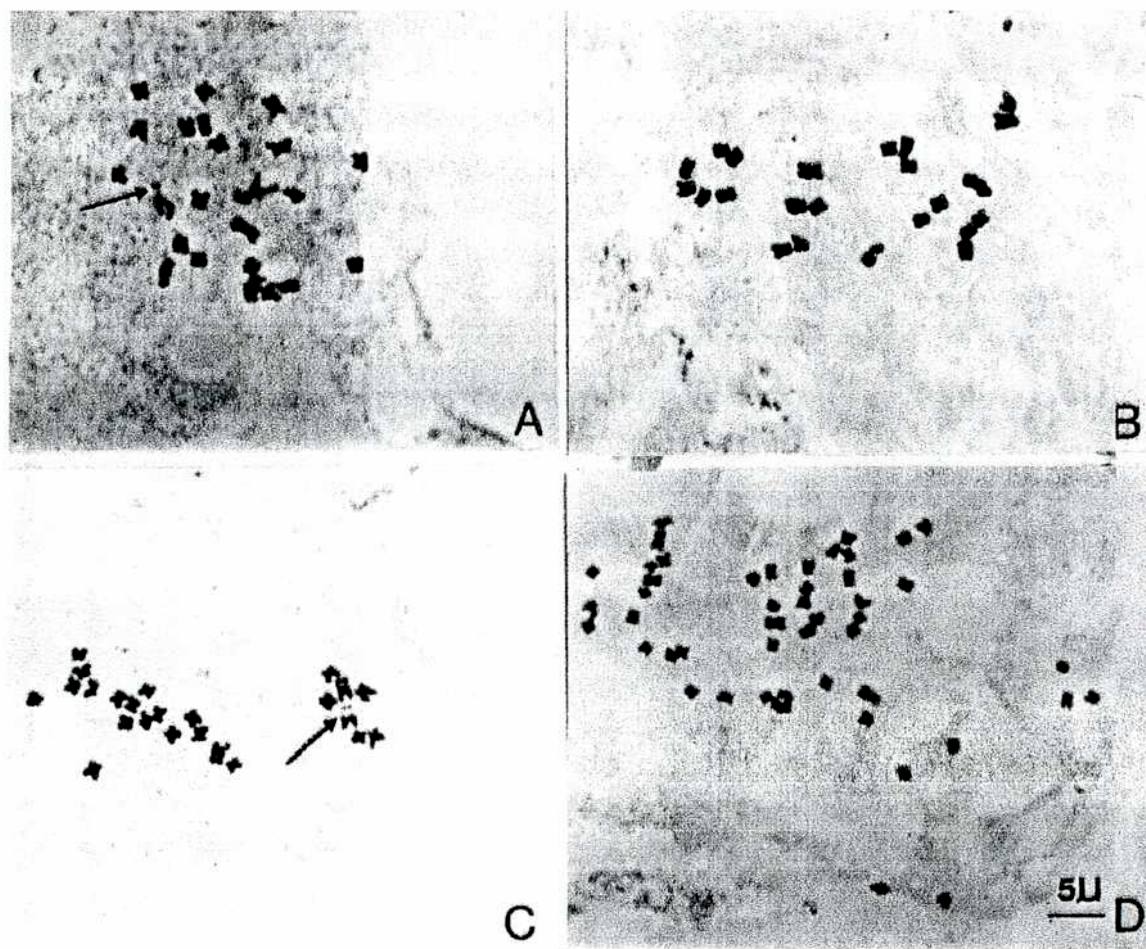


Tabla 6: Detalle de las entradas analizadas, nombre del coleccionista, recuentos cromosómicos, número de nucleolos, construcción de idiogramas y contenido de ADN.

Espece	Entrada	Plo- día	Construc- ción de Idio- grama	Nucleo- los	Conte- nido de ADN	Espece	Entrada	Plo- día	Construc- ción de Idiograma	Nucleo- los	Conte- nido de ADN
<i>S. chacoense</i>	Oka 7309	2x		2			Oka 7618 B	2x		2	
	Oka 7546	2x	SI	2	SI		Oka 7619 A	2x		2	
	Oka +Luc 4810	2x	SI	2	SI		Oka 7617	2x	SI	2	SI
	Oka +L uc	2x		2		<i>S. vernei</i>	Oka 7586	2x		2	
	Oka 2955	2x		2							
<i>S. commersonii</i> ssp. <i>malmeanum</i>	Oka 7313	2x	SI	2	SI		Oka 5798	2x		2	
	Oka 7310	2x		2			Oka 7652 K	2x	SI	2	SI
	Oka + Cla 7254	2x		2		<i>S. gourlayi</i>	Oka 5421	4x		?	
	Oka 7292	2x		2			Oka 7626	4x		4	SI
	Oka + Cla 7270	2x		2			Oka 7680	2x	SI	2	SI
<i>S. kurtzianum</i>	Oka-Luc 4964	2x		2		<i>ssp saltense</i>	Oka 4837	2x		?	
	Oka-Luc 4946	2x		2		<i>ssp gourlayi</i>	Oka 3804	4x		?	
	Oka-Luc 4971	2x		2			Oka 7592	2x	SI	2	SI
	Oka-Luc 4937	2x		2		<i>S. oplocense</i>	Oka 5478	6x		6	SI
	Oka 6138	2x	SI	2	SI		Oka 5476	6x		6	
	Oka 4986	2x		2			Oka 3964	6x		6	
	Oka 7494	2x	SI	2	SI						
<i>S. tarijense</i>	Oka 5633	2x		2		<i>S. acaule</i> ssp. <i>acaule</i>	Oka 7648	4x		4	SI
	Oka 5882	2x		2			Oka 4377	4x			
	Oka 5889	2x		2			Oka 5756	4x			
	Oka 5891	2x		2			Oka 4005	4x			
	Oka 6147	2x		2		<i>S. tuberosum</i> ssp. <i>tuberosum</i>	var Huinkul B.75.44.18xB	4x		4	SI
<i>S. spegazinii</i>	Oka 6108	2x		2							
	Oka 4201	2x		2							
	Oka 7506	2x	SI	2	SI						
<i>S. megistacrolobum</i>	Oka 3787	2x		2		<i>S. tuberosum</i> ssp. <i>andigena</i>	Oka 7674	4x		4	SI
	Oka 4430	2x		2			Oka 7507	4x		4	SI
	Oka 7504	2x	SI	2	SI		clon 483	4x			
	Oka 7493	2x		2			clon 493	4x			
<i>S. microdontum</i> ssp <i>gigantophyllum</i> ssp <i>malmeanum</i> ssp <i>microdontum</i> "	Oka 7530	2x		2			clon 557	4x			
	Oka 6881	2x		2			clon662	4x			
	Oka 4398	2x		2			clon 668 a	4x			
	Oka 7634	2x	SI	2	SI		clon796	4x			
	Oka 7657	2x y	SI	2 (2x)	SI		clon796	4x			
<i>S. venturi</i>	Oka 7585	2x		2			clon796	4x			
	Oka 7609	2x		2			clon796	4x			
							clon799	4x			

Además de realizar el recuento cromosómico, se estimaron las longitudes cromosómicas de al menos una placa metafásica de cada entrada (Tabla 7).

Con estos datos se construyeron los cariotipos, de una entrada para cada especie diploide y se dibujaron los ideogramas correspondientes, ver Fig. 11 (agrupando a los cromosomas en pares homólogos como se describe en Materiales y Métodos).

Fig. 11: Ideogramas de las especies diploides.



Todos los cromosomas resultaron ser metacéntricos o submetacéntricos. Raramente se detectaron constricciones secundarias. No obstante, su presencia fue confirmada mediante la tinción de los nucleolos con nitrato de plata (que permitió establecer la existencia de un máximo de dos organizadores nucleolares en todos los citotipos diploides). (Ver Tabla 6 y más adelante).

Se realizó la medición de cada brazo cromosómico con lo que se calcularon los parámetros descriptos en la Tabla 7.

Tabla 7: Datos obtenidos de las mediciones de las longitudes de brazos de cada cromosoma de las especies indicadas. **Long. total:** suma de las longitudes de todos los brazos cromosómicos del complemento; **CV inter:** coeficiente de variación intercromosómico; **Par l/c:** par largo/corto; **RBP:** Razón de brazos promedio; **CV RB:** coeficiente de variación de las Razones de Brazos; * promedio de 5 o 3 placas metafásicas.

Especie	Long. total	CV inter	Par l/c	RBP	CV RB	Correl
<i>Vrn 7617</i>	31,32	18,63	1,88	0,72	22,18	-0,673
<i>Spg 7506</i>	32,41	20,21	1,92	0,64	22,47	-0,086
<i>Vnt 7657</i>	33,66	13,78	1,57	0,69	27,36	+0,336
<i>Cmm7313*</i>	34,71	22,30	1,81	0,70	26,70	-0,527
<i>Mcd 7634</i>	35,30	13,35	1,48	0,76	27,27	+0,560
<i>Ktz 6138</i>	37,02	18,40	1,64	0,64	32,68	+0,117
<i>Chc4810*</i>	38,4	16,69	1,72	0,67	23,11	
<i>Opl 7592*</i>	38,77	18,59	1,80	0,65	22,95	
<i>Chc7546</i>	38,97	16,60	1,90	0,71	33,12	-0,494
<i>Mga 7504</i>	39,05	13,48	1,53	0,65	28,84	-0,525
<i>Tar 7494*</i>	41,6	18,85	1,76	0,67	22,57	-0,383
<i>Gri 7620</i>	40,69	17,47	1,90	0,70	26,26	-0,177
<i>Ifd 7652</i>	42,49	21,76	1,94	0,71	23,32	-0,450

La comparación de las medias de las longitudes totales de los cromosomas mediante análisis de la varianza (Tabla 8) en 4 de las especies (marcadas con * en la Tabla 7) confirmó la existencia de diferencias significativas entre ellas con $P < 0,05$.

En particular mediante el test de Tukey se evidenciaron diferencias significativas entre *S. tarijense* y *S. commersonii*

Tabla 8: Análisis de la varianza de las longitudes cromosomas de *S. chacoense*, *S. tarijense*, *S. oplocense* y *S. commersonii* (las longitudes están en micrones).

<i>S. chacoense</i>	<i>S. tarijense</i>	<i>S. oplocense (2x)</i>	<i>S. commersonii</i>
36,8	42,9	42,0	33,5
39,5	47,1	37,6	33,8
37,5	38,6	37,7	36,9
39,2	36,2	38,4	
39,2	43,0	37,8	
prom=38,4	prom=41,6	prom=38,7	prom=34,7
CV=3,30%	CV=10,7%	CV=5,1%	CV=5,9%

ANOVA:

SC entre=88,37	GL= 3	Cmedio= 29,45
SCdentro= 98,99	GL=14	Cmedio=7,071
SCtot=187,362	GL=17	
		F=4,166 *S

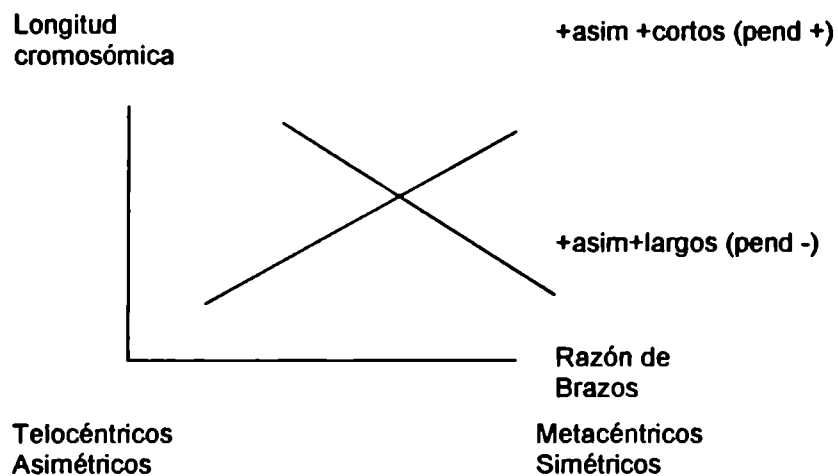
Con el objeto de comparar la uniformidad de tamaños de los cromosomas del complemento, se analizó el coeficiente de variación intercromosómico para cada uno de los individuos. La especie cuyos cromosomas resulta-

cromosomas resultaron más uniformes fue *S. megistacrolobum* y la que reflejó mayor variación fue *S. commersonii*. La diferencia entre ambas fue del 38%.

En cuanto a la asimetría del cariotipo, un estimador utilizado en otro género (*Festuca*, Dubcovsky, 1989) fue la razón de brazos promedio (brazo mayor/brazo menor, promediando las de todos los cromosomas del complemento). En este caso la variabilidad interna fue notablemente menor (4% a 6%) y comparable a los datos obtenidos para gramíneas). Sin embargo no se observaron diferencias significativas entre las 4 especies analizadas.

La homogeneidad de los cromosomas en cuanto a sus razones de brazos se calculó a través del Coeficiente de Variación de las Razones de Brazos CVRB, que osciló del 22,4% al 33,1%. La correlación entre las razones de brazos con la longitud de cada cromosoma, indicó si los cromosomas más largos fueron los más asimétricos (-) o no (+).

Esquema de la correlación entre longitudes de los cromosomas y RB.



La mayoría de las especies mostró que los cromosomas más asimétricos eran los más largos, si bien algunas (3) mostraron lo contrario y en una no hubo correlación. En ningún caso se pudo observar algún otro tipo de asociación con los demás datos.

Cuando se compararon el cociente entre el par mayor y el par menor, en todos los casos el par más largo no superó el doble del más corto y el ANOVA

de las 4 especies analizadas no mostró diferencias significativas, esto sugiere que esta característica está conservada en todo el grupo evaluado.

Conclusiones:

Si bien el estudio de los cariotipos no evidenció grandes diferencias dentro del grupo (como ocurriera en otros casos, como en los géneros *Oxalis*, *Festuca*, *Elymus*), se detectaron algunas variaciones de tamaño de cromosomas que pudieron ser correlacionadas con el contenido de ADN (ver más adelante).

Cabe destacar que todas las mediciones de longitudes están muy influenciadas por la contracción cromosómica lograda por el "veneno mitótico", por lo tanto hay que ser cuidadoso con las conclusiones que se deriven de estos datos. No obstante, ha sido considerado que la utilización de agua fría como pretratamiento (utilizada en este trabajo) para la visualización de los cromosomas, no produce efectos artificiales en la morfología de los cromosomas (Iijima y Fukui, 1991). Sin embargo si uno relativiza esos valores, como ocurre con los estimadores que son cocientes de longitudes, las conclusiones serán certeras. Sin embargo, dado el escaso tamaño de los cromosomas el error en las mediciones es elevado, contrastando con lo que ocurre en otros sistemas, donde este tipo de estudio proporcionó información altamente confiable de gran valor para la caracterización de estas entidades (como por ejemplo *Festuca* y *Oxalis*). Por lo tanto, en el caso de *Solanum*, debe recurrirse a otras herramientas más precisas.

2.2. Cuantificación del contenido de ADN

Con el objeto de conocer el contenido de ADN de las especies silvestres de papa que aún no cuentan con este dato, y dada su importancia en estudios moleculares, como la utilización de estas nuevas herramientas para estudios de variabilidad genética, factibilidad de mapeo genético y aislamiento de genes mediante el clonado posicional, como así también la posibilidad de poder detectar híbridos somáticos entre distintas especies sobrepasando con esta estrategia a las barreras reproductivas (Valkonen et al, 1994), se llevó a cabo este estudio mediante microdensitometría de células somáticas de ápice radicular.

2.2.1. Calibración del sistema

Con el objeto de estimar el grado de precisión con que el sistema determina la microdensitometría nuclear, se analizaron 15 núcleos (Tabla 9) con distintos contenidos de ADN, tres repeticiones de cada uno y se calcularon los coeficientes de variación correspondientes.

Tabla 9: Absorbancia promedio de 15 núcleos con tres repeticiones (expresada en unidades arbitrarias). Se detallan los promedios de las tres lecturas, los valores de σ y los coeficientes de variación.

U. a.	U. a.	U. a.	Promedio	σ	CV%
4,34	4,43	4,36	4,377	0,047	1,1
5,01	5,17	5,03	5,07	0,082	1,7
3,99	4,11	4,24	4,113	0,125	3,0
3,25	3,33	3,34	3,307	0,049	1,5
3,39	3,17	3,40	3,32	0,13	3,9
3,07	3,14	3,17	3,126	0,051	1,6
1,18	1,44	1,48	1,367	0,163	11,9
0,98	0,97	1,10	1,017	0,072	7,1
5,25	5,23	5,14	5,207	0,058	1,1
28,63	28	27,9	28,18	0,395	1,4
26,17	26,46	25,76	26,13	0,351	1,35
25,79	25,97	26,46	26,07	0,347	1,33
97,30	93,30	94,4	95	2,066	2,18
88,3	88,85	88,54	88,56	0,276	0,3
92,5	95,15	90,45	92,7	2,356	2,54

Se observó que con valores de absorbancia menores que 1,2, los coeficientes de variación fueron muy elevados, fenómeno que no ocurrió cuando los valores fueron mayores de 88.

2.2.2. Establecimiento de un patrón de referencia:

Un punto importante para realizar cálculos microdensitométricos comparativos precisos es poder relativizar las mediciones respecto a un patrón de referencia estándar confiable. Dado que el contenido de ADN estimado en un cultivar de *S. tuberosum* por Jacobsen *et al.* (1983) fue de aproximadamente 3,6 pg, se decidió utilizar como referencia a los núcleos de eritrocitos de pollo, los cuales poseen una cantidad de ADN de rango similar (2,8 pg). La utilización de núcleos de eritrocitos aviares tiene amplios antecedentes ya que fueron utilizados para varios estudios similares (ver por ejemplo Rash *et al.*, 1971;

Tempelaar, 1980). Para ello fue necesario poner a punto su fijación, coloración y tiempos de hidrólisis (datos no mostrados).

Sin embargo, las lecturas fluctuaron bastante y los valores de ADN de los eritrocitos de pollo no correlacionaron con los de los núcleos de papas medidos en las mismas condiciones. Por lo tanto fue necesario buscar otro tejido como patrón de referencia. **Tabla 10 y 11.**

Tabla 10: Núcleos de distintas especies de papas silvestres y medición conjunta de eritrocitos de pollo en las mismas condiciones. Se indican las unidades arbitrarias de las especies vegetales y también las correspondientes a los eritrocitos de pollo. En las últimas tres columnas se indican los picogramos de ADN por especie, los valores de σ y los coeficientes de variación.

Genotipo	n	prom	σ	cv%	pollo	prm	σ	cv%	pg	prom	cv%
<i>Chac4810</i>	20	3,105	0,545	22,5		5,217	0,448	8,5	1,666	1,933	15,4
	20	3,345	0,7	27,1		4,156	0,288	6,9	2,254		
	6	3,504	0,669	26,4		5,225	0,285	5,4	1,878		
<i>Tar7494</i>	10	4,348	0,591	16,3		5,115	0,271	5,3	2,381	2,228	10,8
	6	3,962	0,32	9,7		5,176	0,288	5,57	2,143		
	8	3,554	0,94	32		4,605	0,218	4,7	2,161		
<i>Cmm7313</i>	40	3,524	0,46	13,1		4,596	0,355	7,7	2,147	2,135	36,1
	40	3,669	0,354	9,6		4,478	0,483	10,8	2,294		
	30	3,48	0,777	22		5,38	0,635	11,8	1,811		
	30	3,11	0,577	18,5		3,764	0,404	10,7	2,313		
	18	3,325	0,82	25		4,988	0,314	6,3	1,866		
	14	3,106	1,3	41,9		3,661	0,205	5,6	2,376		
<i>Gr7680</i>	30	3,004	0,799	27		5,529	0,248	4,5	1,521	1,717	26,8
	30	3,771	0,817	22		4,869	0,49	8,4	2,168		
	7	2,954	0,422	14,2		5,491	0,253	4,6	1,506		
	12	2,688	0,705	26,2		4,504	0,618	13,7	1,671		

Los elevados valores de los CV de los genotipos evaluados se debieron al testigo que se utilizó. Según estos datos y los que se muestran en la tabla 8f y tabla g, no se recomienda el uso de este tejido como material de referencia.

Los núcleos de cebolla (*Allium cepa*) han sido utilizados como patrón de referencia (Martínez y Ginzo, 1985) en numerosos trabajos. A pesar de poseer un contenido de ADN mayor (33,5 pg) que el de las especies de *Solanum*, tiene ventajas en cuanto al tratamiento de fijación, coloración, etc. Del mismo modo que para el otro testigo anteriormente mencionado, se correlacionaron los valores de ADN en unidades arbitrarias con núcleos de papas medidos y tratados de la misma forma (previa determinación del tiempo de hidrólisis óptimo). Tabla 12 y 13. Los resultados indicaron que los núcleos de cebolla se

comportan como un patrón de referencia confiable para los experimentos de medición.

Tabla 11. Unidades arbitrarias de las especies de *Solanum* y el testigo (eritrocitos de pollo). Coeficiente de correlación entre unidades arbitrarias de papas y unidades arbitrarias de eritrocitos de pollo R= 0,12

Abs. u.a. de papas	Abs. u. a. de e pollo
3,105	5,217
3,345	4,156
3,504	5,225
4,349	5,115
3,962	5,176
3,554	4,605
3,524	4,596
3,669	4,478
3,48	5,38
3,11	3,764
3,325	4,988
3,106	3,661
3,004	5,529
3,771	4,869
2,954	5,491
2,688	4,504

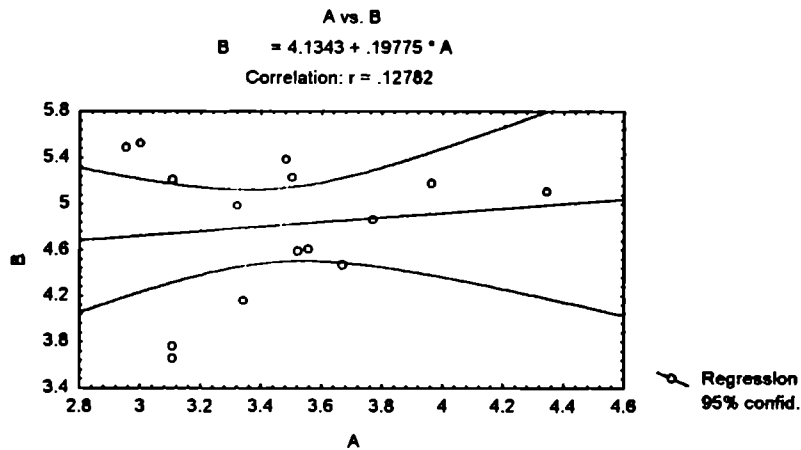
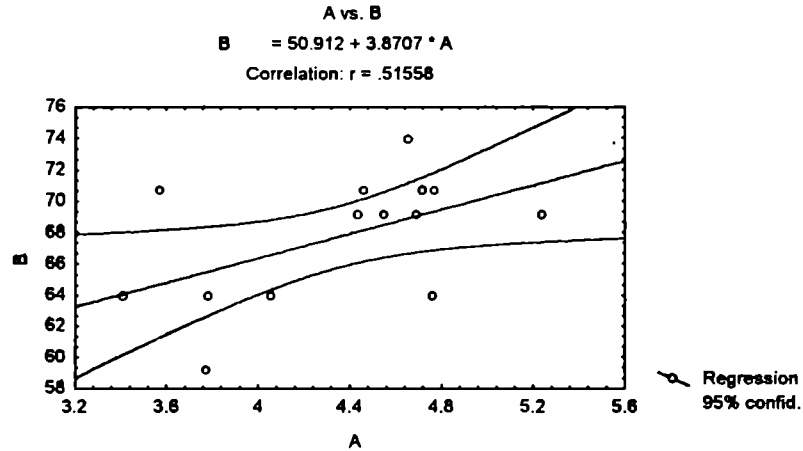


Tabla 12: Núcleos de distintas papas silvestres y medición conjunta de núcleos de cebolla en las mismas condiciones. Se indican las unidades arbitrarias de las especies vegetales y las correspondientes al testigo (columna promedio). En las últimas tres columnas se indican los picogramos de ADN por especie utilizando a este patrón para la conversión, como así también los valores de σ y los coeficientes de variación.

Especie	n	prom	σ	cv%	cebol	prm	σ	cv%	pg	prom	cv%
<i>Chc4810</i>	25	4,695	0,356	7,6	69,13	3,872	5,6	2,275	2,211	6,3	
	14	4,714	0,296	6,3	70,72	3,112	4,4	2,233			
	19	4,056	0,304	7,5	63,93	8,5	13,3	2,125			
<i>Tar7494</i>	25	4,436	0,323	7,3	69,13	3,872	5,6	2,149	2,273	18,1	
	16	4,773	0,334	7	70,72	3,112	4,4	2,261			
	19	4,538	0,313	6,9	59,13	6,091	10,3	2,571			
	14	4,654	0,236	5,1	73,93	2,292	3,1	2,109			
<i>Cmm7313</i>	25	5,235	0,4932	9,4	69,13	3,872	5,6	2,536	2,104	27,5	
	20	3,782	0,379	10	64,00	7,169	11,2	1,979			
	19	4,466	0,296	6,6	70,72	3,112	4,4	2,115			
	20	3,408	0,262	7,7	63,93	8,5	13,3	1,786			
<i>Gri7680</i>	26	4,551	0,304	6,7	69,13	3,872	5,6	2,205	2,132	28,7	
	25	4,763	0,394	8,3	64,00	7,169	11,2	2,493			
	20	3,57	0,239	6,7	70,72	3,112	4,4	1,691			
	18	3,774	0,17	4,5	59,13	6,091	10,3	2,138			

Tabla 13. Unidades arbitrarias de las especies de *Solanum* y el testigo (núcleos de cebolla). Coeficiente de correlación entre unidades arbitrarias de papas y unidades arbitrarias de eritrocitos de pollo: $R= 0,51557$

Abs. u. a. de papa	Abs. u. a. de cebolla
A	B
4,695	69,139
4,714	70,726
4,056	63,936
4,436	69,139
4,773	70,726
4,654	73,931
5,235	69,139
3,782	64,005
4,466	70,726
3,408	63,936
4,551	69,139
4,763	64,005
3,570	70,726
3,774	59,133



2.2.3. Optimización del tiempo de hidrólisis de las preparaciones citológicas procedentes de las especies de *Solanum* y *Allium cepa*

Se construyó una curva de hidrólisis con HCl 5N a 22°C para determinar el tiempo óptimo de la misma. Para ello se utilizó a *S. commersonii* ssp. *malmeanum* como representativa de todas las papas, dado que las observaciones de los cariotipos no mostraban grandes diferencias en el tamaño de los cromosomas con respecto a las demás especies analizadas. Paralelamente se hizo lo mismo con el patrón elegido, *Allium cepa*. Tabla 14.

Tabla 14: Tiempos de hidrólisis a temperatura ambiente de *S. commersonii* ssp. *malmeanum* y *A. cepa* y sus correspondientes absorbancias en unidades arbitrarias.

<i>S. commersonii</i>				<i>A. cepa</i>			
Tiempo	n	prom	CV%	Tiempo	n	prom	CV%
20	32	4,300	9,4	20	30	42,881	11,2
30	30	4,776	13	30	30	57,72	13,3
40	40	4,845	16	40	30	63,863	8,8
50	34	4,899	9,2	50	30	70,311	13,6
60	40	4,410	12	60	30	57,36	9,2

Los tiempos óptimos para *S. commersonii* oscilaron entre 30 y 50 minutos, y para *A. cepa* entre 40 y 50 minutos. Se decidió estandarizar el tiempo en 50 min dado que la variabilidad interna fue menor para *Solanum*. En el caso de *Allium* se prefirió que la hidrólisis sea total, situación que se alcanzó a los 50 min. Esto se decidió debido a que si bien el coeficiente de variación fue algo más alto que el correspondiente a 40 min, una de las ventajas de la hidrólisis a temperatura ambiente es la relativa insensibilidad a pequeñas diferencias en los tiempos de incubación (experiencia personal y Greilhuber y

Ebert, 1994) a diferencia de lo que ocurre con la más frecuentemente utilizada hidrólisis en caliente (en HCl 1N a 60 °C).

2.2.4. Cuantificación del contenido de ADN de las especies de *Solanum*

En la Tabla 15 se detallan los contenidos de ADN medidos por densitometría en células de ápices radiculares de plantas micropropagadas axénicamente. Los mismos oscilaron desde 1,96 pg a 2,31 pg por núcleo para los citotipos diploides; de 3,61 pg a 4,74 pg para los tetraploides y fueron de 6,21pg para el citotipo hexaploide.

Los datos fueron transformados a partir de unidades arbitrarias a pg usando como patrón de contenido de ADN de referencia de núcleos de cebolla (33,5 pg). Los resultados se analizaron usando el método de comparaciones múltiples de Kruskal-Wallis y se pudieron detectar diferencias significativas entre las especies con $p < 0,1$. Fig.12 y 13.

Tabla 15: Contenido de ADN en Especies de *Solanum*. **A:** especies diploides, **B:** especies tetraploides y **C:** especies hexaploides. Se indica el número de núcleos medidos (N), el contenido de ADN promedio en pg y la varianza σ .

A			
Espece	N	Contenido de ADN (pg)	
<i>S. spegazzinii</i> (Oka 7506)	120	1,963	0,0288
<i>S. vernei</i> (Oka 7616)	81	1,945	0,0394
<i>S. venturii</i> (Oka 7657)	89	2,002	0,0362
<i>S. commersonii</i> ssp. <i>malmeanum</i> (Oka 7313)	102	2,006	0,0388
<i>S. chacoense</i> (Oka 7546)	72	2,076	0,0480
<i>S. chacoense</i> (Oka 4810)	102	2,087	0,0333
<i>S. gourlayi</i> (Oka 7680)	105	2,075	0,0337
<i>S. infundibulliforme</i> (Oka 7652)	75	2,195	0,0628
<i>S. microdontum</i> ssp. <i>microdontum</i> (Oka 7634)	94	2,152	0,0360
<i>S. oplocense</i> (Oka 7592)	112	2,150	0,0227
<i>S. megistacrolobum</i> (Oka 7504)	93	2,232	0,0317
<i>S. tarijense</i> (Oka 7494)	93	2,279	0,0251
<i>S. kurtzianum</i> (Oka 6138)	89	2,307	0,0288
B			
Espece	N	Contenido de ADN (pg)	σ
<i>S. tuberosum</i> ssp. <i>tuberosum</i> (B.75.44.18 x Parakal)	93	3,605	0,0560
<i>S. acaule</i> (Oka 7648)	103	3,896	0,0491
<i>S. venturii</i> (Oka 7657)	52	4,234	0,0544
<i>S. gourlayi</i> (Oka 7626)	86	4,0675	0,0443
<i>S. tuberosum</i> ssp. <i>andigena</i> (Oka 7507)	96	4,679	0,0570
<i>S. tuberosum</i> ssp. <i>andigena</i> (Oka 7674)	81	4,740	0,0535
C			
Espece	N	Contenido de ADN (pg)	
<i>S. oplocense</i> (Oka 5478)	95	6,213	0,0624

Se observa que existe una variación continua en el contenido de ADN (Tabla 15), tanto entre las especies diploides como entre las tetraploides. Entre las primeras se observaron diferencias máximas del 15% y entre las segundas de hasta un 23%.

Cuando se compararon los contenidos de ADN por genoma haploide en los diferentes citotipos (Tabla 16), se observó que los tetraploides (*S. gourlayi*, *S. venturii*) poseían más ADN que los respectivos diploides. En cambio, el citotipo hexaploide mostró menos ADN por genoma haploide que el respectivo diploide. Todas estas diferencias fueron significativas con $p < 0,1$.

Tabla 16: Contenido de ADN por genoma haploide de los distintos citotipos poliploides.

Especie	Ploidía	Cont. ADN (genom. haploide)	Desv. standard
<i>S. gourlayi</i>	2x	1,038	0,0168
	4x	1,169	0,0111
<i>S. venturii</i>	2x	1,001	0,0181
	4x	1,058	0,0136
<i>S. oplocense</i>	2x	1,075	0,0114
	6x	1,036	0,0104

2.3. Correlación entre el contenido de ADN y la longitud cromosómica:

En los trabajos publicados con mediciones de contenido de ADN siempre se trató de correlacionar estos datos con otras características más fácilmente observables, como por ejemplo el volumen, área o longitud cromosómica. Por ejemplo se observaron correlaciones significativas y positivas en *Lathyrus*, *Vicia*, *Tradescantia* (Martínez y Ginzo, 1985; Bennet et al., 1982).

En otros casos puntuales de híbridos somáticos entre *S. brevidens* y *S. tuberosum* por ejemplo se utilizaron dichas mediciones para determinar la existencia de aneuploidías (Valkonen et al, 1994).

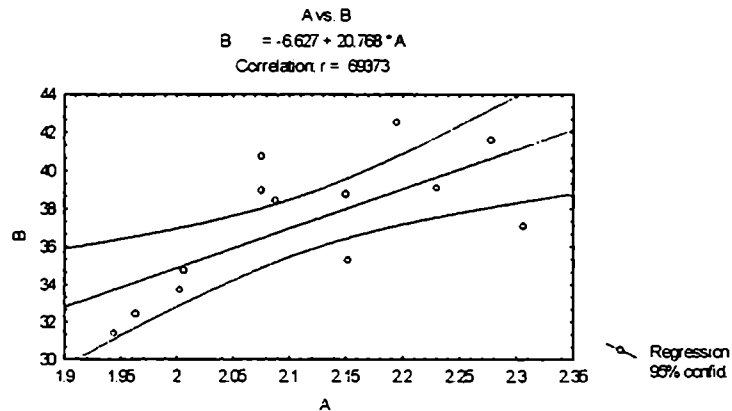
A pesar de las pequeñas diferencias en el contenido de ADN existentes entre las especies estudiadas de *Solanum* aquí también fue posible correlacionar estos datos con las longitudes de los complementos

cromosómicos de las mismas en forma positiva y significativa ($r = 0,691$ S $p=0,001$) Tabla 16, Fig 14.

Tabla 16: Correlación entre el contenido de ADN y la longitud total resultante de la sumatoria de las longitudes individuales de cada uno de los cromosomas para las especies diploides: $r=0,636^*$ S $p=0,001$

	pg	long (μ)
<i>Spg 7506</i>	1,963	32,41
<i>Vrn 7617</i>	1,945	31,32
<i>Vnt 7657</i>	2,002	33,66
<i>Cmm7313*</i>	2,006	34,71
<i>Chc7546</i>	2,076	38,97
<i>Chc4810*</i>	2,087	38,4
<i>Grl 7680</i>	2,075	40,69
<i>Ifd 7652</i>	2,195	42,49
<i>Mcd 7634</i>	2,152	35,30
<i>Opl 7592*</i>	2,150	38,77
<i>Mga 7504</i>	2,232	39,05
<i>Tar 7494*</i>	2,279	41,6
<i>Ktz 6138</i>	2,307	37,02

Fig.14.: Gráfico de la correlación entre contenido de ADN (pg) y longitud total resultante de la sumatoria de las longitudes individuales de cada uno de los cromosomas para las especies diploides (μ)



2.4. Contenido de ADN y clonado posicional

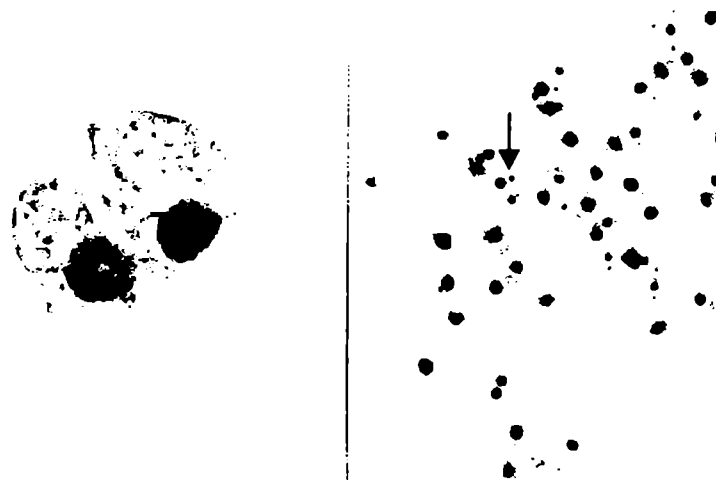
Los valores de contenido de ADN han tomado trascendencia para los proyectos de clonado posicional utilizando marcadores, por lo que resulta interesante expresarlos en términos de pares de bases (o kilopares de bases). Convirtiendo de picogramos a pares de bases (teniendo en cuenta que 1 pg= 926.500 kpb, los contenidos de ADN expresados en Mpb oscilaron desde 1,794 Mpb a 2,137 Mpb para los citotipos diploides; y de 3,340 a 4,355 Mpb para las

tetraploides y de 5,756 Mpb para la hexaploide. Las diferencias de contenido de ADN por genoma haploide serían aproximadamente de: 127.000 kpb para *S. gourlayi*; de 55.000 kpb para *S. venturii* y de 37.000 kpb para *S. oplocense*.

2.5. Detección de nucleolos

La tinción de nucleolos (Fig. 15) reveló la presencia de organizadores nucleolares en los individuos estudiados. Se comprobó que todas las especies diploides mostraban, a lo sumo, 2 nucleolos (dado que existe el fenómeno de fusión de los mismos). En cuanto a las especies tetraploides, se observó en todas ellas un número máximo de 4 (su frecuencia fue menor que para el caso de los diploides y se observaron también casos con 1, 2 y 3 nucleolos). Cuando se estudió la especie hexaploide, con gran dificultad pudieron detectarse hasta 6 nucleolos, observando muchas células con nucleolos fusionados (con mayor frecuencia que en el caso de los tetraploides). Se pone en evidencia de esta manera que no existe inhibición nucleolar en los individuos analizados.

Fig 15: Nucleolos teñidos con nitrato de plata. A: 2 nucleolos :*S. chacoense* Oka 4810 ($2n=24$); B: *S. gourlayi* Oka 7626 ($2n=48$). La flecha indica la célula que presenta los 4 nucleolos sin fusionarse.



3. Análisis de variabilidad de los genes ribosomales

Para estudiar la variabilidad de estos genes se enfocó el análisis en la subunidad completa y en el espaciador intragénico transcrito.

3.1. Polimorfismos de longitud de la subunidad completa

Este tipo de variabilidad se evaluó observando la movilidad de los fragmentos de restricción generados por enzimas que cortan el ADN genómico en un único sitio dentro de la subunidad repetitiva. Entre ellas, *Xba*I, *Eco*RV y *Pst*I que liberaron fragmentos del tamaño de la subunidad completa, coincidiendo con lo descrito para *Solanum* y *Lycopersicon* (Gruber, 1991; Vallejos *et al.*, 1988).

Los tamaños se estimaron por comparación de movilidades relativas con un patrón de genoma de fago λ digerido con *Hind*III después de "Southern blot" hibridizado con la sonda que correspondió a la subunidad completa de trigo.

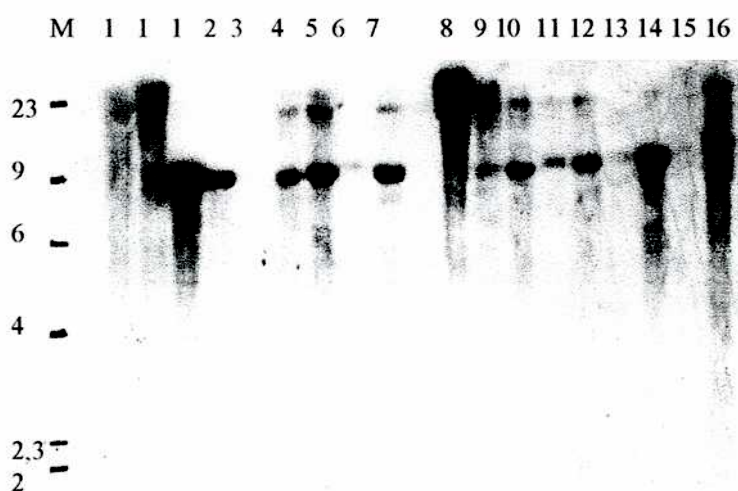
3.1.1. Polimorfismos de longitud evidenciados con las endonucleasas de restricción *Xba*I y *Pst*I

Como primera aproximación se realizaron electroforesis en geles de agarosa al 1% de ADN digerido con la enzima de restricción *Xba*I (Fig. 16) para descartar la posibilidad de que existieran fragmentos de menor tamaño que pudieran perderse en geles de menor concentración y más cortos (fragmentos de 6,5 y 1 kb) ya que se habían descrito para el cultivar Sirtema (Gruber 1991). Otras dos especies que también evidenciaron la presencia de un sitio *Xba*I extra fueron *S. jamesii*, *S. polyadenium* (Borisjuk *et al.*, 1994) aunque ambas especies pertenecen a distintas series taxonómicas, *Pinnatisecta* y *Poliadenia* respectivamente.

Como en ninguna de las especies evaluadas pudieron detectarse fragmentos chicos (sugiriendo, por lo tanto, la ausencia de algún sitio adicional), se cambió la concentración de agarosa al 0,7% y la corrida se realizó durante 36

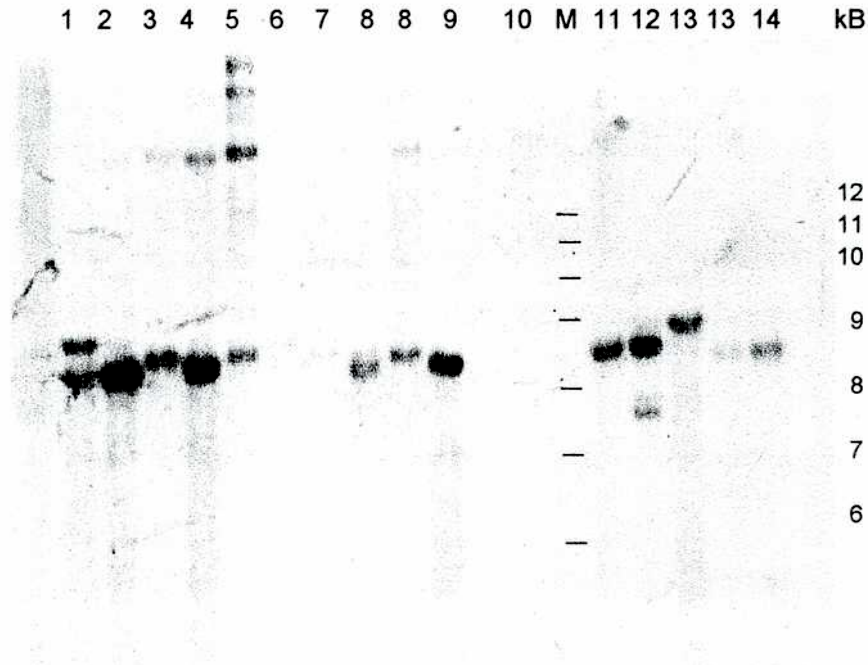
hs a menor voltaje permitiendo así una mejor resolución de los fragmentos de mayor tamaño (Fig 17 y Tabla 17). Sin embargo, no puede descartarse que existan efectivamente sitios *Xba*I adicionales que generen fragmentos pequeños (derivados del espaciador intergénico) los cuales no pudieron ser detectados porque la sonda (de trigo) no tiene homología suficiente en la zona del espaciador externo para hibridar.

Fig 16: Autorradiografía de especies representativas de *Solanum* cortadas con *Xba*I e hibridadas con la sonda pTA71. M: marcador de peso molecular. 1: chc; 2: tar; 3:ktz; 4:ifd; 5:vrn; 6:cmm; 7:mcd; 8: grl2x; 9: grl4x; 10: acl; 11:aclg; 12:Baraka;13:Spunta; 14:opl2x; 15:opl6x; 16:ktz (in vitro)



Los geles de agarosa al 1% se sometieron a 1,25 V/cm durante 17 hs en TAE 1x. Después fueron transferidos a membranas de nylon y éstas fueron hibridadas con la sonda radiactiva pTA71. Las membranas fueron autoradiografiadas y fotografiadas. En el carril 1 se observa un estándar de fragmentos de tamaño conocido (ADN de fago lambda digerido con *Hind* III). En los carriles siguientes se observan individuos representativos de todo el grupo. Puede notarse la ausencia de fragmentos menores al tamaño de la subunidad completa que migra en una posición correspondiente al tamaño de 9 kpb. Los tamaños se estimaron por comparación de movilidades relativas con un patrón de genoma de fago λ digerido con *Hind*III después de "Southern blot" hibridizado con la sonda que correspondió a la subunidad completa de trigo.

Fig.17: Autorradiografía de especies representativas de *Solanum* cortadas con *Xba*I e hibridadas con la sonda pTA71 en electroforesis de agarosa al 0,7%. M: marcador de peso molecular. 1:chc; 2:tar; 3:ktz; 4:ifd; 5:vm; 6:cmm; 7:mcd; 8:grl; 9:adg; cl; 10: Baraka; 11cv King Ed; 12: M. Pipper; 13: opl; 14:vnt



Los geles de agarosa al 0,7% se sometieron a 1,25 V/cm durante 36 hs en TAE 1x. Después fueron transferidos a membranas de nylon y éstas fueron hibridadas con la sonda radiactiva pTA71. Las membranas fueron autoradiografiadas y fotografiadas. En el carril M se observa un estándar de fragmentos de tamaño conocido (Escalera de 1KB. Gibco-BRL). Estas condiciones de corrida permitieron que se observaran claramente los distintos tamaños de las subunidades y la presencia de más de un tipo de ellas en algunas de las especies (el genotipo # 13 de *S. chacoense*; el # 55 de *S. gourlayi* y el cv Mary's Pipper). Los tamaños se estimaron por comparación de movilidades relativas con un patrón de 1Kb Gibco-BRL después de "Southern blot" hibridizado con la sonda que correspondió a la subunidad completa de trigo.

Como puede observarse en la **Tabla 17**, los tamaños estimativos de las unidades de repetición variaron según la enzima utilizada. Esto puede explicarse por:

- a) El error en la determinación de los tamaños de fragmentos de gran longitud para los cuales los geles de agarosa tienen baja resolución.
- b) La existencia de sitios de restricción que liberaron fragmentos muy pequeños que no fueron detectados por perderse con el frente de corrida.
- c) La existencia de sitios de restricción que liberaron fragmentos provenientes del espaciador intergénico con falta de homología con la sonda utilizada (por las

diferencias de secuencias en las regiones menos conservadas) que al perder ligamiento físico con las regiones conservadas dejan de hibridar.

Tabla 17: Tamaños de la subunidad repetitiva a partir de fragmentos generados por cortes con las enzimas de restricción *XbaI* y *PstI*

Número de indiv	Genotipo	<i>XbaI</i>	<i>PstI</i>
13	<i>Chc7546</i>	9,53 y 8,73	
14	<i>Chc7309</i>	8,62 ^a	
20	<i>Cmm7373</i>	9,40	
43	<i>Mcd7634</i>	9,17	
49	<i>Vrn7617</i>	9,17	
51	<i>lfd7652k</i>	8,95	
55	<i>Grf7680</i>	9,17 y 8,73	
60	<i>Opl5478</i>	8,95	
64	<i>Acf7648</i>	8,87	8,90
72	<i>Adg7507</i>	?	9,42
240	<i>Ktz6138</i>	9,17	
290	<i>Tar7494</i>	8,87	
440	<i>Vnt 7657</i>	8,95	
520	<i>Grf7626</i>	9,17	9,42
570	<i>Opl7592</i>	8,95?	
730	<i>Tbr (Baraka)</i>	9,17	
731	<i>Tbr (M.Pipper)</i>	9,17 y 7,87	
732	<i>Tbr EC</i>	9,06	

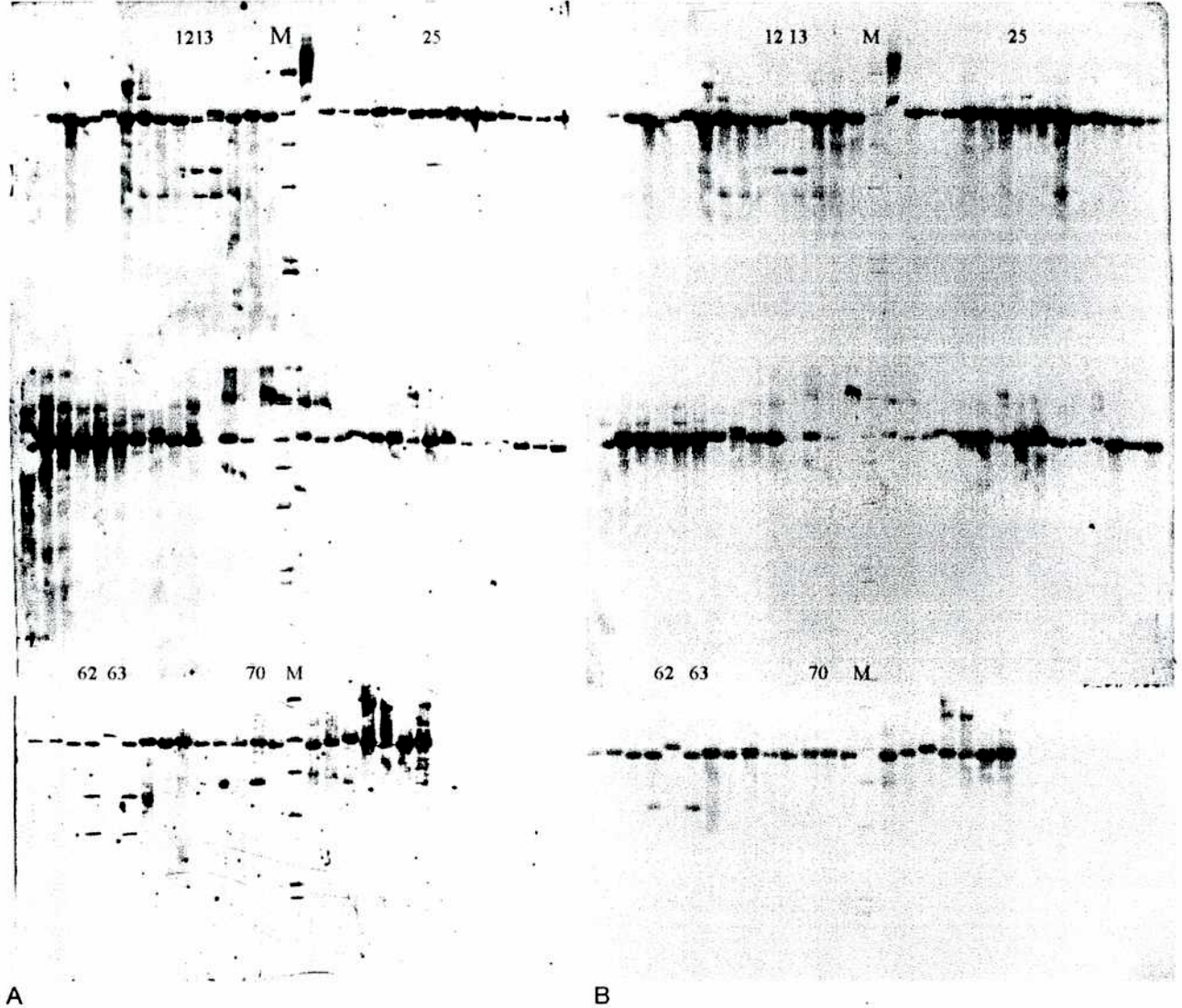
La primera y la segunda columna enumeran las entradas analizadas mediante Southern blot de sus respectivos ADN's previamente digeridos con las enzimas *XbaI* (tercera columna) y *PstI* (cuarta columna) y sometidos a una electroforesis larga (12 V/cm durante 36 hs en geles de agarosa al 0,7%). En la tercera y cuarta columna se expresan los tamaños estimados (en kpb) por comparación con la migración relativa de un estándar de ADN de 1Kb.

^a los tamaños se expresan en kb

3.1.2. Polimorfismos de longitud evidenciados con la endonucleasa de restricción *EcoRV*

Con el objeto de resolver las incongruencias explicitadas se llevaron a cabo ensayos adicionales con una tercera enzima de restricción que resultó ser diagnóstica para la determinación del tamaño de las subunidades, combinando con hibridaciones con otras sondas. (Tabla 18, Fig.18). Las sondas utilizadas fueron el ITS de papa amplificado por PCR y el fragmento 28S de trigo (Ver MyM). El sitio *EcoRV* está altamente conservado en un gran rango de géneros y está ubicado en el segmento de ADN que codifica para el 5,8S (Fig. 19).

Fig18: Autorradiografías de las especies de *Solanum* cortadas con *EcoRV* e hibridadas con A: ITS y B: 28S.



Los gels de agarosa al 0,8% se sometieron a 1,25 V/cm durante 12 hs en TAE 1x. Después fueron transferidas a membranas de nylon y éstas hibridadas con la sonda con dig-UTP ITS y radiactiva (P^{32}) correspondiente al 28S. Las membranas fueron autoradiografiadas y fotografiadas. En los carriles X se observa un estándar de fragmentos de tamaño conocido (DNA de fago Lambda digerido con Hind III). Se observan los fragmentos que corresponden a las subunidades completas (aproximadamente 9kpb), como así también los fragmentos extras de menor tamaño: 5,1 kpb y 4 kpb en ambas entradas de *chc* (ind. 12 y 13); 5,1 kpb en *ktz* (ind. 25); 5,1kpb y 3,6 kpb en *acl* (ind. 62 y 63) y de 5,9 kpb en *adg* ind. 70. Los fragmentos de 5,1 kpb de *S. chacoense* y *S. acaule* contienen la secuencia del ADN 25S.

Fig.19 : Esquema del mapa de restricción de la subunidad completa basado en datos de secuencia de distintos bancos de datos y en Borisjuk *et al.* 1994 y en los resultados de este trabajo.

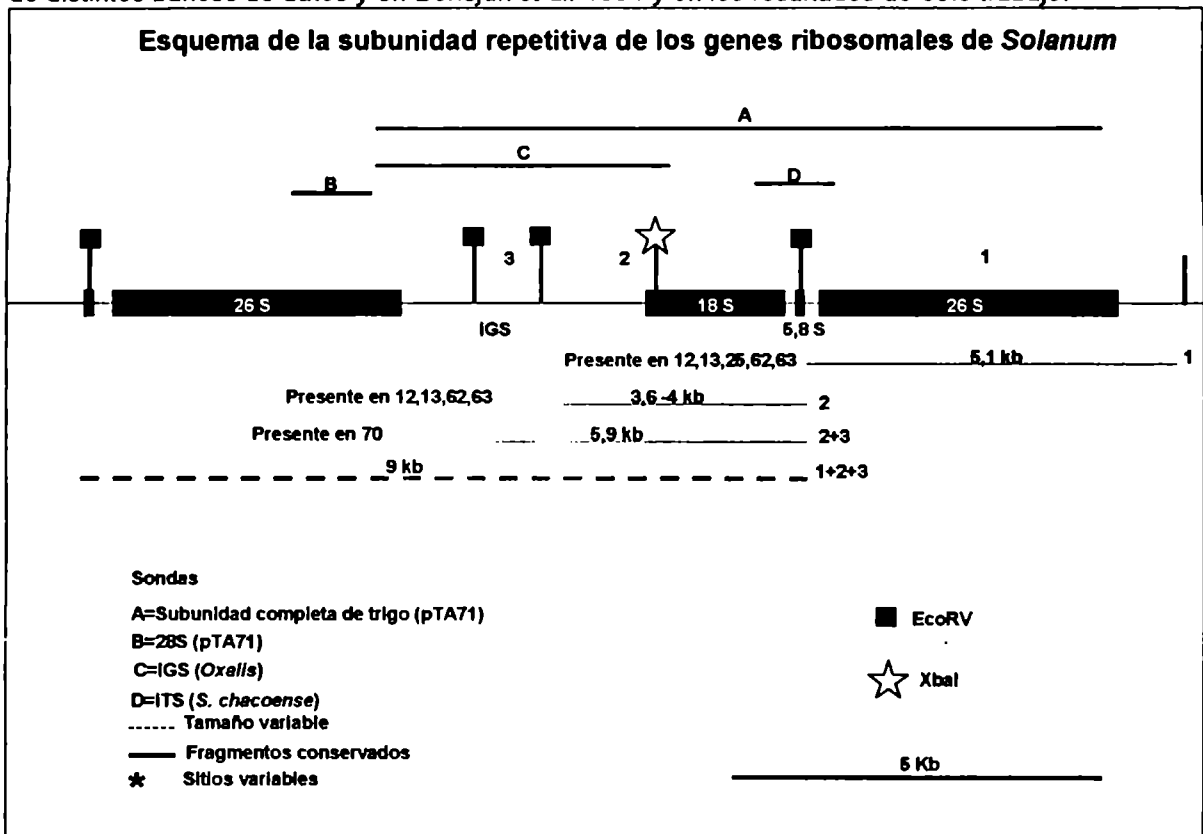


Tabla 18: Tamaños de fragmentos de restricción generados por EcoRV e hibridación con ITS

Número de individuo	Genotipo	Subunidad	Fragmentos extras	Número de individuo	Genotipo	Subunidad	Fragmentos extras
1	Chc 6116	9		42	<i>Mcd 4398</i>	8,7 *	
2	<i>Chc 4957 1</i>	9		43	<i>Mcd 7634</i>	8,7	
3	<i>Chc 4957 2</i>	8,7		44	Vnt 7609	9	
4	<i>Chc 4957 3</i>	8,4		45	<i>Vnt 7618B</i>	9 *	
6	<i>Chc 4956 cultivo</i>	8,9		46	<i>Vnt 7619A</i>	8,7	
8	<i>Chc 2955 cultivo</i>	9		47	<i>Vnt 7585</i>	8,7	
9	<i>Chc 2955 2</i>	8,9		48	Vrm 7614	8,7	
11	<i>Chc 5341</i>	8,9		49	<i>Vrm 7617</i>	9	
12	<i>Chc 7546</i>	8,9		50	<i>Vrm 7586</i>	8,9	
13	<i>Chc 7546 3</i>	9,8 y 8,9	5,1 y 4	51	<i>Ifd</i>	8,7	
14	<i>Chc 7309</i>	8,9	5,1 y 4	52	Grl 4837	8,7	
16	<i>Chc 4810 80</i>	9,2		53	<i>Grl 4841</i>	9	
17	<i>Chc 4810</i>	9		54	<i>Grl 5421</i>	8,7	
19	Cmm 7310	10 *		55	<i>Grl 7680</i>	8,9	
20	<i>Cmm 7313</i>	10		56	<i>Grl 3804</i>	8,4	
21	<i>Cmm 7254</i>	10		57	Opl 5503	8,4	
22	<i>Cmm 7270</i>	10 *		58	<i>Opl 5476</i>	8,4	
23	<i>Cmm 7292</i>	10		59	<i>Opl 3964</i>	8,9	
24	Ktz 4937	9,8 *		60	<i>Opl 5478</i>	8,9	
25	<i>Ktz 4946</i>	9,8	5,1	61	Acl 4377	8,6	
26	<i>Ktz 4964</i>	10,5 y 9,8		62	<i>Acl 5756</i>	8,6	5,1 y 3,6
27	<i>Ktz 4971</i>	9,8		63	<i>Acl 4005</i>	8,6	5,1 y 3,6
28	<i>Ktz 4986</i>	9,8		64	<i>Acl 7648</i>	8,9	
29	Tar 5889	9,6		65	Adg 799	8,7 *	
30	<i>Tar 5882</i>	9,6		66	<i>Adg 668</i>	9,1	
31	<i>Tar 5891</i>	9,6		67	<i>Adg 557</i>	8,9	
32	<i>Tar 5633</i>	8,1		68	<i>Adg 493</i>	8,9	
33	Spg 6108	9 y 8,5		69	<i>Adg 662</i>	9	
34	<i>Spg 6147</i>	9 *		70	<i>Adg 483</i>	9,1	5,9
35	<i>Spg 4201</i>	9,4 y 8,7		71	<i>Adg 796</i>	8,9	
36	Mga 3787	9		72	<i>Adg 7507</i>	8,7	
37	<i>Mga 4430</i>	9,2		73	Huinkul MAG	9,1	
38	<i>Mga 7504</i>	10,1 y 9,2		74	<i>Tomate</i>	9,8	
39	Mcd 6881	8,7		75	Goniocalyx	8,9	
40	<i>Mcd 7530</i>	8,7 *		76	Verrucossum	8,7	
41	<i>Mcd 7493</i>	8,7		77	<i>Phureja</i>	9,1	

La primera y segunda columna enumeran las entradas analizadas mediante Southern blot de sus respectivos ADNs previamente digeridos con la enzima EcoRV y sometidos a una electroforesis (12 V/cm durante 12 hs en geles de agarosa al 0,8%). En la tercera y cuarta columna se expresan los tamaños estimados (en kpb) por comparación con la migración relativa de un estándar de ADN de fago Lambda digiendo con Hind III. ^a los tamaños se expresan en kb. * indica banda presumiblemente doble. Todos los fragmentos que corresponden al tamaño de las subunidades completas hibridaron con el 28S. En negrita se indican los fragmentos extras que también hibridaron con el 28S.

Con la enzima *EcoRV* y la sonda correspondiente al ITS, se observaron los tamaños de las subunidades repetitivas de todos los genotipos evaluados (**Tabla 18**, columna 3). Algunos de ellos, además mostraron la existencia de otro sitio, presente en el espaciador intergénico (**Fig. 19**) que generó fragmentos cuyos tamaños se muestran en la **Tabla 18**, columna 4, individuos 12,13,25,62,63 y 70. Con el objeto de determinar la ubicación del sitio extra de restricción, se hibridó la membrana con el fragmento que codifica para el ARN 28S. Se determinó de esta manera, que los fragmentos de 5,1 kb. de las especies *S.chacoense* y *S. acaule*, poseen esta secuencia (**Fig. 18 A y B**, comparar los carriles de los individuos 12,13,62 y 63), y por lo tanto pudo ubicarse el sitio extra en la porción 5' del espaciador intergénico próximo al segmento 25S. (**Fig. 18**, fragmento 1 (5,1 kb) que incluye a la secuencia del 25S.)

Heterogeneidad de las unidades de repetición localizadas mediante la enzima de restricción *EcoRV* y las sondas ITS y 28S:

En muchos de los genotipos evaluados, se observaron bandas muy anchas e intensas del tamaño de la subunidad completa, sugiriendo la presencia de más de una banda de tamaños muy cercanos, indicando por lo tanto la existencia de más de un tipo de subunidad (heterogeneidad de las unidades de repetición). En otros individuos las diferencias de movilidades entre las subunidades fueron lo suficientemente grandes como para poder detectar dos bandas separadas. En algunos casos ya mencionados, se evidenciaron polimorfismos de sitios de restricción *EcoRV* (**Fig. 19**). Un fenómeno similar fue descrito también por Powell *et al* (1991); para algunos cultivares de *S. tuberosum* (3 de 27)). Si bien los fragmentos extras no fueron del mismo tamaño, no puede asegurarse que se trate de distintos sitios ya que lo más probable es que las diferencias se deban al cambio en los números de las subrepeticiones del espaciador externo.

El fragmento de 5,1 kpb está conservado en estas cuatro OTUs (12,13,62 y 63) que mostraron este fenómeno, correspondiéndose con el fragmento que incluye al 28S (dado que hibrida con la sonda respectiva). El clon de *S. tuberosum*

ssp andigena (ind 70) presentó un fragmento extra de 5,9 kpb y que en este caso no hibridó con la sonda del 28S (indicando que no se corresponde al mismo segmento que las demás entradas y que abarcaría el espaciador externo (porción 3'), la subunidad 18S y el ITS1 (ver Fig.19). La falta del otro segmento que completaría la subunidad total, sugiere la existencia de un sitio *EcoRV* río abajo del extremo 3' del ITS2 que impidió que la sonda lo detectara. No obstante hay que mencionar que se trata de subunidades minoritarias.

La sumatoria de los fragmentos extras (en el caso de las dos entradas de *S.chacoense*), hace suponer que existen subunidades de distinta longitud, que además poseen heterogeneidad en la secuencia nucleotídica blanco de la endonucleasa de restricción en las distintas unidades de repetición en tándem del cistrón. (comparar los tamaños de las subunidades y la suma de los fragmentos extras en los ind. 12,13,62 y 63). Así, en el ind 13, existirían 3 tamaños de subunidades y 2 en el 12). En cambio, en las entradas de *S. acaule*, la suma de los valores de los fragmentos extras, concordaron (0,1 kpb de diferencia) con los valores de las subunidades (tabla 18, ind. 62 y 63, col 3 y 4 y ver Fig 19) evidenciando que estas dos entradas no poseen distintas variantes de tamaños pero sí de sitios.

Conclusiones de *EcoRV*:

A pesar de que la corrida electroforética no fue demasiado resolutive y pudo introducir errores o diferencias en los tamaños estimados, puede observarse que en algunos casos se detectó la presencia de dos tipos de subunidades que no se resolvieron con *EcoRV*.

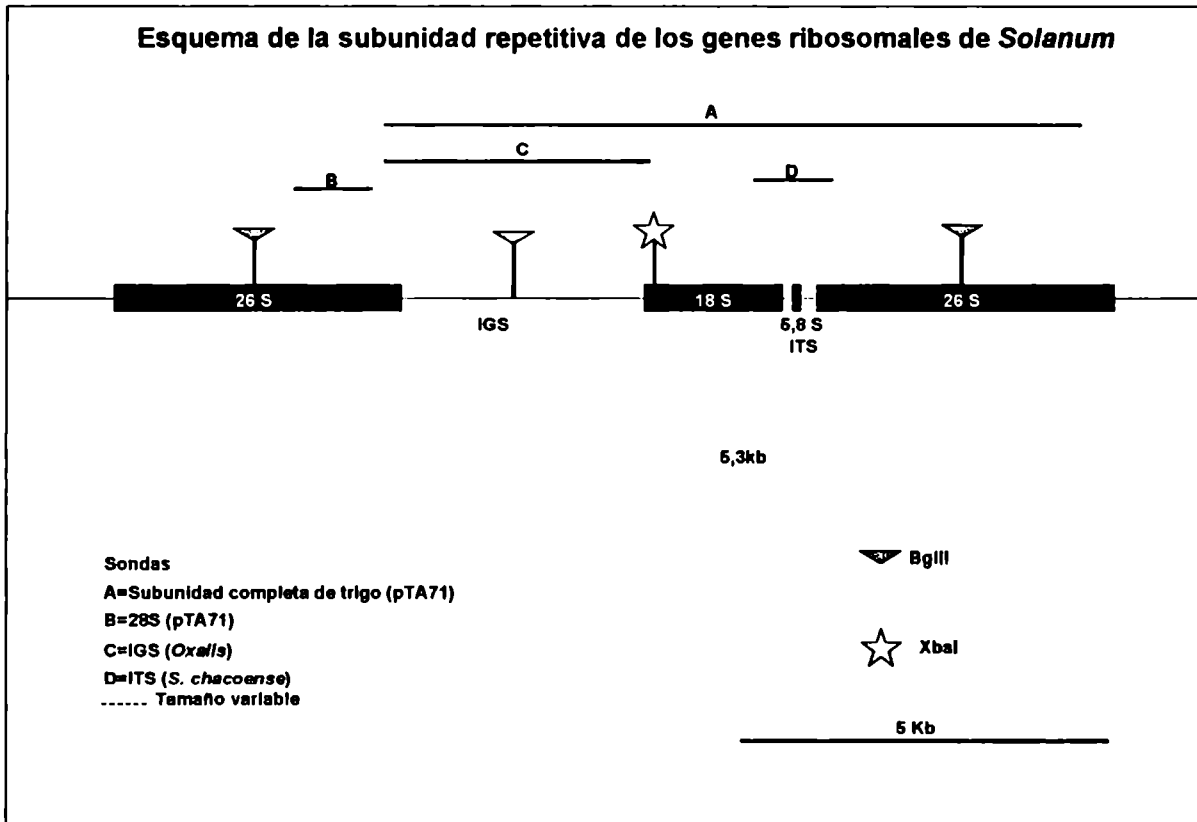
Con la excepción de algunas entradas de *S. chacoense*, *S. kurtzianum*, *S. spegazzini*, *S.tuberosum ssp tuberosum* , *S. tuberosum ssp andigena*, el resto mostró un solo tamaño de subunidad.

Se detectaron algunos polimorfismos de sitio, pero en subunidades minoritarias (sitios extras tabla 18, fig.18)

3.1.3. Polimorfismos de longitud evidenciados con la endonucleasa de restricción *Bgl*II

Una de las enzimas que evidenció la existencia de un único sitio de corte dentro de la subunidad 25S en muchas especies de los géneros *Solanum* y *Lycopersicon* fue *Bgl*II. En la **fig. 20** se muestra un esquema con los sitios de restricción de la enzima *Bgl*II en la unidad de repetición de *Solanum tuberosum ssp tuberosum*.

Fig. 20: Esquema de los sitios de restricción de *Bgl*II de la subunidad repetitiva



Al digerir los ADNs con esta enzima y someterlos a electroforesis, Southern blot e hibridación con la sonda pTA71 se obtuvieron los siguientes patrones de bandas:

Todas las entradas mostraron la presencia de 3 bandas que hibridan con esta sonda con los siguientes tamaños estimados: 9 kpb, 5,3 kpb y un fragmento variable entre los genotipos de 4 kpb. (ver, **Fig. 20, 21** y **tabla 19** col 3,4 y 5). Al

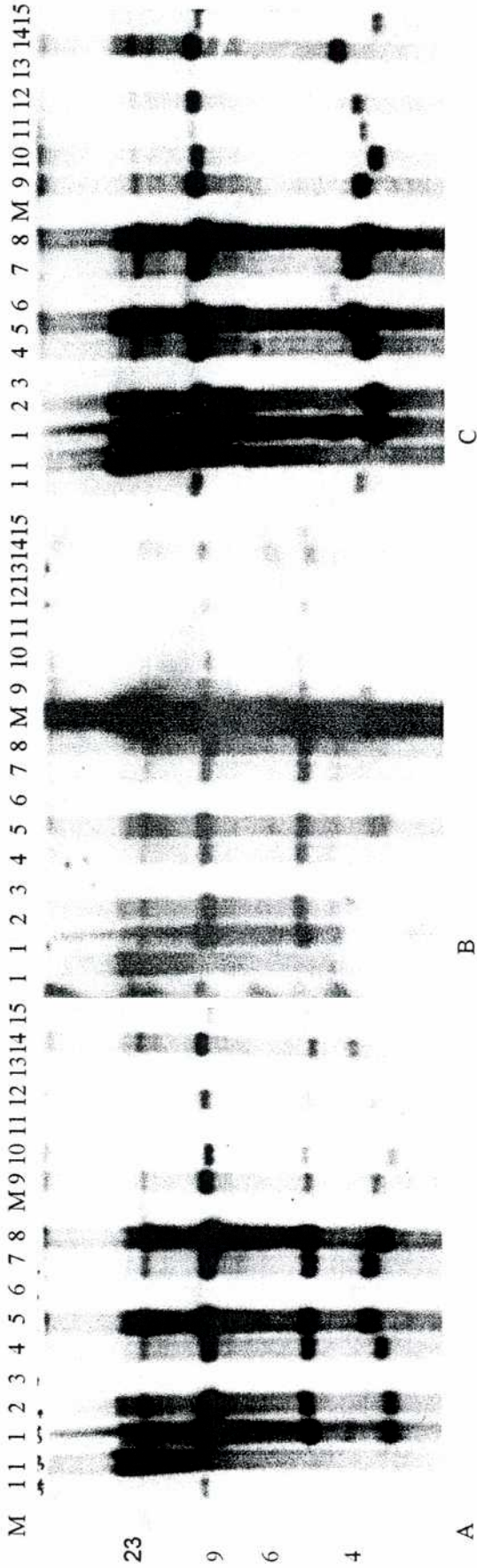
hibridar con sondas más acotadas en cuanto a secuencia se pudo deducir que las bandas de 9 kpb y 4 kpb contienen secuencias de la región codificante para el ARN ribosomal de 25S y que las bandas de 9 kpb y 5,3 kpb contienen secuencias que codifican al segmento ITS. (comparar **fig. 21 A** con **B** y con **C** y ver **tabla 19** col 4 y 5). La presencia del fragmento variable de 4 kpb (Tabla 19, quinta columna) evidencia las diferencias en las secuencias adyacentes al extremo 5' del gen para el ARN de 25S. Las diferencias entre las sumas de los fragmentos (**Tabla 19**, col. 7) y las subunidades totales (col.3) indican la existencia de heterogeneidad de tamaño y de sitios *Bgl*II.

Tabla 19: Fragmentos de restricción de genotipos representativos del grupo, generados por la enzima *Bgl*II y distintas sondas.

Nro de Ind.	Genotipo	<i>Bgl</i> II	<i>Bgl</i> II	<i>Bgl</i> II	Estimación:	Diferencias
13	<i>Chc7546</i>	9,4 y 8,9	5,3	4,4 y 3,7	9,7 y 9,0	0,3 y 0,1
14	<i>Chc7309</i>	9,4	5,4	4,	9,4	-
20	<i>Cmm7373</i>	no evaluado				
43	<i>Mcd7634</i>	9,4	5,3	4,1	9,4	-
49	<i>Vrn7617</i>	9,6	5,3	4,1	9,4	0,2
51	<i>lfd7652k</i>	9,4	5,4	3,9	9,3	0,1
55	<i>Gr7680</i>	9,3	5,4	3,9	9,3	-
60	<i>Opl5478</i>	9,4	5,3	3,7	9,0	0,4
64	<i>Acl7648</i>	9,4	5,5	3,7	9,2	0,2
72	<i>Adg7507</i>	9,9	5,4	4	9,4	0,5
240	<i>Ktz6138</i>	no evaluado				
290	<i>Tar7494</i>	9,2	5,4	3,7	9,1	0,1
440	<i>Vnt 7657</i>	no evaluado				
520	<i>Gr7626</i>	9,7	5,4	4	9,4	0,3
570	<i>Opl7592</i>	10,1	5,3	4,4	9,7	0,4
730	<i>Tbr (Baraka)</i>	9,8	5,4	4,0	9,4	0,4
731	<i>Tbr</i>	no evaluado				
732	<i>Tbr EC</i>	no evaluado				

La primera y segunda columna indican los genotipos seleccionados. En la tercera se detallan los tamaños en kpb de los fragmentos que codifican para la subunidad completa (cuyo sitio del espaciador externo está ausente o metilado). La cuarta columna indica los tamaños de los fragmentos que codifican para los ITS (monomórficos), la quinta, los tamaños de restricción que contienen al gen que codifica para el ARN 25S y el extremo 5' del espaciador externo. La sexta columna muestra la suma de las dos columnas anteriores y la séptima la diferencia entre el tamaño de subunidad que poseen el sitio del espaciador externo y el tamaño de la subunidad que no poseen ese sitio. Estos valores indican la existencia de subunidades de longitudes variables.

Fig. 21: Autorradiografías de especies representativas de *Solanum* cortadas con *Bgl*II e hibridadas con pTA71 (A), ITS (B2) y 25S (C3).



Los geles de agarosa al 0,8% se sometieron a 1,25 V/cm durante 12 hs en TAE 1x. Después fueron transferidos a membranas de nylon y estas fueron hibridadas con la sonda radiactiva pTA71 (A), con dig-UTP ITS (B) y con la sonda radiactiva (P^{32}) correspondiente al 28S (C). Las membranas fueron autoradiografiadas y fotografiadas. En el carril 1 se observa un estándar de fragmentos de tamaño conocido (DNA de fago Lambda digerido con *Hind* III). Se observan los fragmentos que corresponden a las subunidades completas que no poseen el sitio *Bgl*II del espaciador externo (desde 9,2 kpb a 10,1 kpb.), como así también los fragmentos monomórficos de 5 kpb y los polimórficos que oscilan de 3,7 kpb a 4,4 kpb. de las subunidades que poseen el sitio del espaciador externo. Se detectaron en el genotipo 13, 2 tamaños de subunidades que carecen del sitio del espaciador externo (carriles 13 de las figuras).

V31017818 N A 391
 FCEY N BIBLIOTECA

Discusión de polimorfismos detectados mediante *Bgl*II

Con esta enzima y usando como sonda a pTA71, se obtuvieron fragmentos de 3 tamaños (**Tabla 19** (col 3, 4 y 5 y **Fig.21 A**): el mayor de aproximadamente 9 kpb que correspondió a la subunidad completa (**Tabla 19**, col 3) lo cual indica que hay subunidades que carecen del sitio en el espaciador externo). Un fragmento de tamaño intermedio, de alrededor de 5 kpb (no variable entre las especies) y el menor, polimórfico que osciló en el rango de 3,6 a 4,4 kpb. (**Tabla 19**, col 5).

Sin embargo y a pesar de estos resultados, la presencia de sitios de restricción de *Bgl*II en el espaciador intergénico fue también demostrada anteriormente para 2 cultivares de *S. tuberosum* (Gruber, 1991). Para comprobar su presencia en las especies analizadas en este trabajo (en tomate todas las variantes de las subunidades poseen un único sitio de corte dentro de estas), se analizaron algunos individuos representativos del grupo en cuestión y se comprobó que existía un sitio extra respecto a *Lycopersicon* (al menos para algunas subunidades repetitivas).

Para determinar la ubicación del ITS entre los distintos fragmentos, se rehibridó la misma membrana con una sonda específica para esta región pudiendo comprobarse que se ubica en el segmento monomórfico de 5 kb (**Tabla 19** y **Fig. 21 B**). Se dedujo además que el sitio *Bgl*II que aparece en las papas (respecto del tomate) es el que se detectó mediante secuencia del espaciador intergénico de *S. tuberosum*, en la posición 1900 del mismo (Borisjuk *et al.*, 1993) y se verificó que la zona variable fue la correspondiente a la a la porción 5' de dicho espaciador donde se describió la presencia de repeticiones de 53 pb en esta región (Borisjuk *et al.*, 1993). La existencia de polimorfismos en esta porción del espaciador fue confirmada cuando se hibridó dicha membrana con la sonda que corresponde al extremo 3' de la secuencia que codifica para el 25S (ver **Fig.21 C**) y además cuando se utilizó la enzima *Dra*I (ver más adelante). Se pudieron distinguir de esta manera dos tipos de espaciadores para la entrada *S. chacoense* (Oka 7546), concordante con los datos de *Xba*I y *EcoRV* anteriores (**Tabla 17, 18**), evidenciando, una vez más, que los polimorfismos de longitud de la subunidad

completa únicamente se originaron por variación de la longitud del espaciador externo.

Esto sugiere que dicha variación de tamaño podría deberse a cambios en el número de subrepeticiones internas que se encuentran en esta zona (Borisjuk et al., 1993, 1994).

3.2. Polimorfismos de restricción

3.2.1. Polimorfismos de restricción evidenciados con la endonucleasa *EcoRI*

Se analizaron los polimorfismos generados con esta enzima de restricción que posee mayor número de sitios dentro de cada subunidad (Fig. 22). Los ADNs digeridos con la misma se hibridaron con pTA71 (subunidad completa), ITS, 25S e IGS (Fig. 23 y 24).

Fig. 22: Esquema de los sitios *EcoRI* de la subunidad repetitiva de los genes ribosomales de *Solanum*

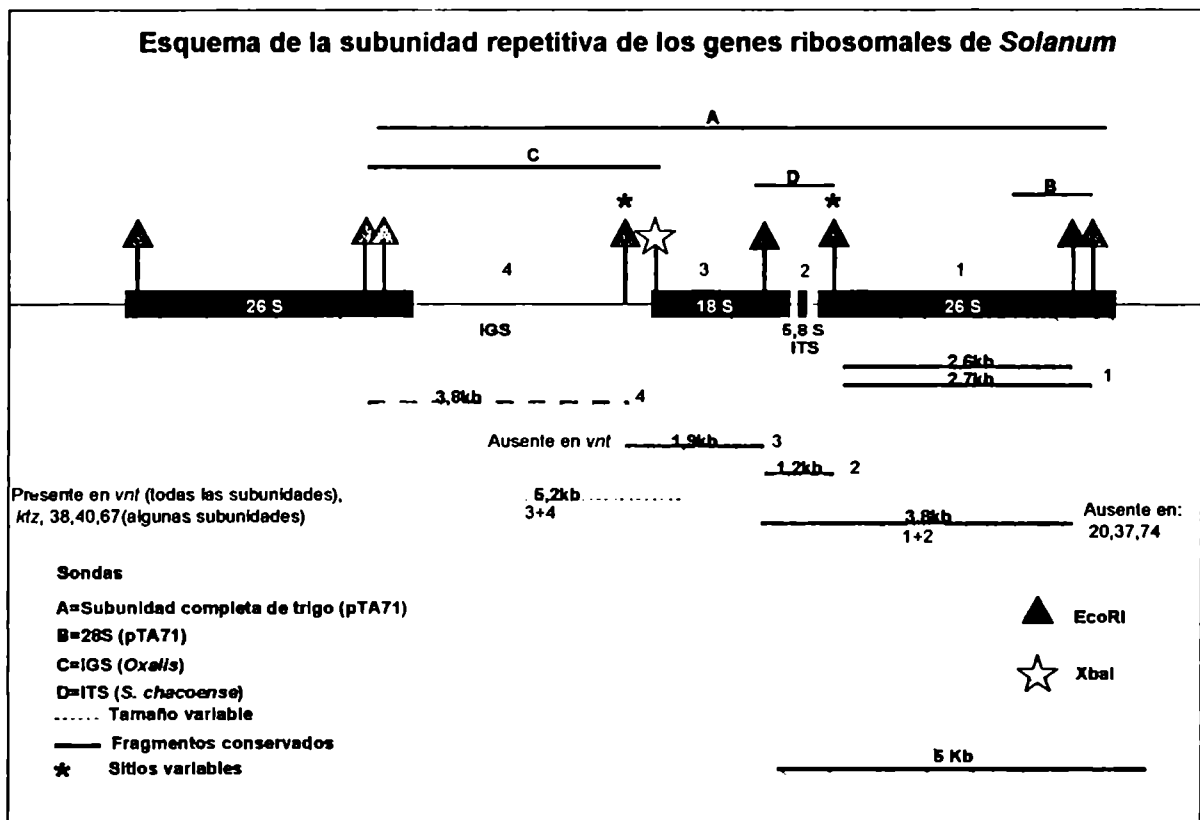


Fig. 23: Autorradiografía de las especies de *Solanum* digeridas con *EcoRI*.

A,B,CyD: Electroforesis durante 12 hs a 1 V/cm ("corrida corta") de todas las muestras hibridadas con pTA71, ITS, 25S e IGS respectivamente; **E, F y G:** Electroforesis durante 17 hs a 1 V/cm ("corrida larga") de algunas especies hibridadas con pTA71, ITS y 25S respectivamente. Se observan los fragmentos monomórficos de 1,2 kb(ITS), 1,87kb (17S según bibliografía) ausente en todas las entradas de *S. venturii* (calle2); 2,7 y 2,6 kb (25S) y los polimórficos mayores de 3,8 kb (que abarcan al 3' del 25S +espaciador externo) y al monomórfico de 3,8 kb, ausente en *S. commersonii* (Oka 7313) (calle 4) y *S. megistacrolobum* (Oka 4430) (calle 3). También se nota la aparición de nuevos fragmentos de x kb en todas las entradas de *S. venturii* (calle 2) y en *S. microdontum ssp gigantophyllum* (Oka 7530) (calle 1)

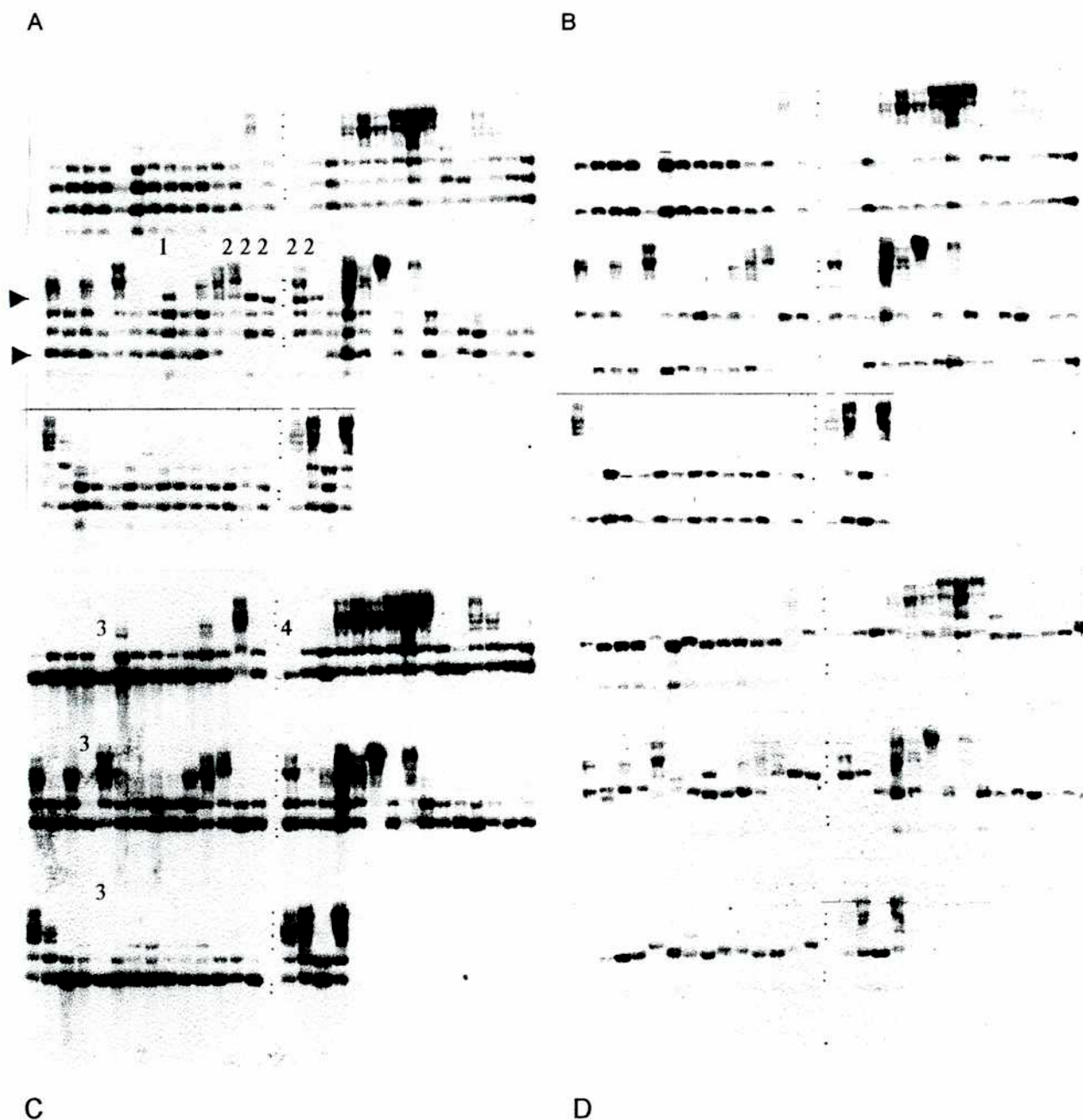
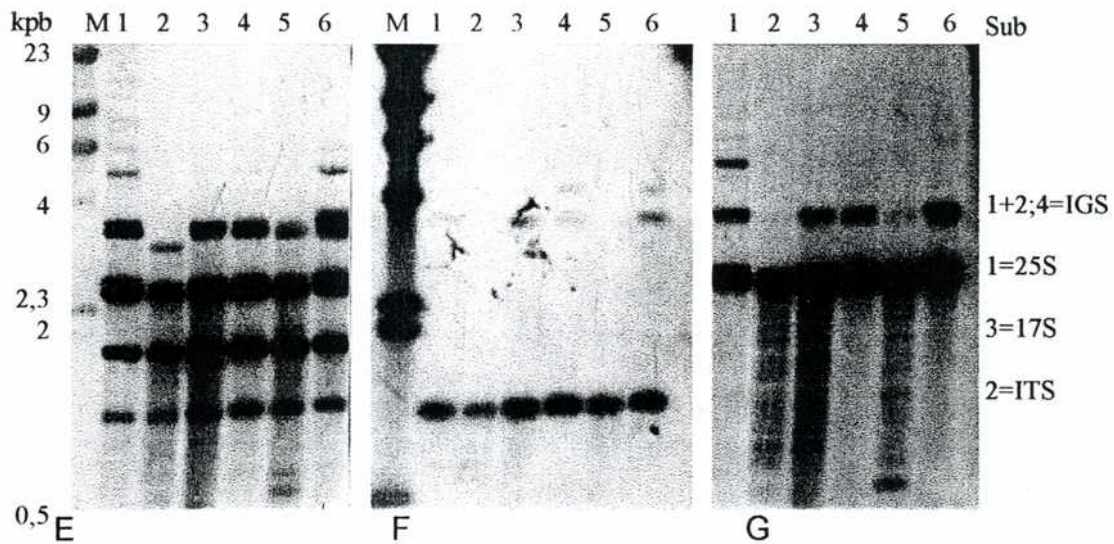


Fig. 23: Autorradiografía de las especies de *Solanum* digeridas con *EcoRI*.

E, F y G: Electroforesis durante 17 hs \cdot 4 V/cm ("corrida larga") de algunas especies hibridadas con pTA71, ITS y 25S respectivamente. Se observan los fragmentos monomórficos de 1,2 kb(ITS), 1,87kb (17S) ausente en todas las entradas de *S. venturii* (calle2); 2,7 y 2,6 kb (25S) y los polimórficos mayores de 3,8 kb (que abarcan al 3' del 25S +espaciador externo) y al monomórfico de 3,8 kb.



Con *EcoRI* y pTA71 se generaron 6-7 fragmentos principales (**Fig. 22 y 23 A, E**). De ellos, 5 fueron monomórficos (1,2 kb (ITS); 1,87 kb (17S); 2,56 y 2,73 kb (25S) y 3,8 kb (ITS +25S)) con la excepción del fragmento de 1,87 que estuvo ausente en todas las entradas de *S. venturii*. (carriles 2). Con el objeto de conocer el sitio de restricción ausente en esta especie, se hibridó esta membrana con sondas más acotadas. Con la sonda correspondiente al IGS se dedujo que se perdió el sitio *EcoRI* del extremo 3' del espaciador externo (**Fig. 22**). Este fenómeno también ocurrió en la entrada de *S. microdontum* Oka 7530 (carril 1), pero a diferencia de *S. venturii*, sólo algunas subunidades perdieron dicho sitio (**Fig. 23 A**, calles indicadas con 1 y 2). Por otro lado se vio con esta misma sonda que además de la banda de 3,8 kb, en varios de los individuos había otra de tamaño mayor y polimórfica (**Fig. 23 D**)

Cuando se hibridó con la sonda que corresponde al 25S pudo observarse los fragmentos de 2,56 y 2,73, como así también el de 3,8 kb (suma de 1,2kb (ITS)+ 2,6 kb (25S) explicable sólo por falta o metilación del sitio ubicado en el 5' del 25S (ver **Fig. 22**). Sin embargo hubo 2 entradas que carecieron de este fragmento de adición (*S commersonii* (Oka 7313) y *S. megistacrolobum* (Oka

4430) (carriles 3 y 4 de la **fig. 23 C**). Esta desaparición de la banda podría explicarse por la existencia, del sitio que está en la región 5' del 25S en **todas** las subunidades repetitivas. En el resto de las especies que poseyeron este fragmento de adición (3,8kb), la diferencia de intensidad sugeriría que entre el 33% y 50% de las unidades repetitivas serían las responsables (perdieron ese sitio); ya que el fragmento de 1,2 kb correspondiente al ITS que está incluido en el de 3,8 kb, también estaba presente. Se observó además que estas bandas de adición fueron de intensidad variable, pero en general de menor fuerza que las de 2,5 o 1,9 kb, pero de mayor intensidad que la de 1,2 kb correspondientes al ITS **Fig. 23 A**. En cambio la señal fue más tenue en el caso de las tetraploides y hexaploides (que incluyen al cultivar de papa Huinkul MAG, a todos los clones de *S. tuberosum* ssp. *andigena* y al tomate estudiado). Esta disminución general de la intensidad sugiere que esos fragmentos podrían estar menos representados por tratarse de especies con ploidías mayores que se estuviesen perdiendo en su evolución.

Otra posibilidad es que el sitio estuviera afectado por metilación (en tomate datos de secuencia (Kiss *et al*, 1989) mostraron que este sitio GAATTC está seguido por CG que propiciaría la metilación como se mencionó anteriormente). No se observaron polimorfismos para esta banda (3,8kb), salvo su ausencia anteriormente mencionada, y se verificó que abarca al 25S y al espaciador intragénico (**Fig 23 C**).

Cuando se trató de corridas más resolutivas y evaluadas con la sonda completa, pudo observarse la presencia de bandas dobles de este tamaño aproximado (0,1 a 0,3 kb de diferencia **Fig 23 E**), como así también diferencias de intensidad entre ellas.

Explicación de ausencia de sitios:

Cabe la posibilidad de que se sean producto de sitios de restricción metilados en algunas unidades. Este fenómeno fue descrito en Borisjuk *et al*, 1994 para *EcoRI* y cita de Gruenbaun *et al*, (1981),

El tamaño de la subunidad completa estimada (9 kb promedio), debería obtenerse como suma de todos los fragmentos generados por enzimas que tienen

sitios de corte múltiples en la unidad de repetición. Sin embargo, la suma de tamaños de los fragmentos suele sobrepasar largamente el tamaño total de la subunidad. En Borisjuk *et al* 1994, se demostró que las bandas de 2,6 y 2,7 kb presentes en todas las especies que ellos analizaron (algunas de las cuales compartimos en este trabajo), pertenecían al fragmento 25S. Esto fue comprobado para todas las especies aquí evaluadas. De esta manera el segmento mayor (2,7 kb) estaría generado por el sitio más próximo al extremo 3' de la secuencia que corresponde al 25 S (conservado en plantas dicotiledóneas y en y el de menor tamaño (2,6 kb) por el sitio que está muy conservado en *Solanaceae*. Entonces la suma de todos los fragmentos (considerando una sola de estas variantes de 2,6 y la de 3,8) coincide con el tamaño aproximado de la subunidad completa. La banda que hibrida con el 25S (3,8 kb) es la suma de ITS y 25S y es monomórfica, (sin considerar su ausencia en las dos entradas anteriormente mencionadas) y la otra corresponde al IGS

Tabla 20: Tamaños de los fragmentos generados por *EcoRI* y la sonda que corresponde al IGS. Se indica además la longitud del espaciador externo para cada individuo, calculada a partir de la diferencia entre el tamaño total estimado a partir de la digestión con *EcoRV* e hibridación con ITS y la suma de los fragmentos que corresponden a los genes propiamente dichos (no variables entre todos los individuos).

^A indica banda presumiblemente doble

^B indica que el fragmento abarca al espaciador externo y al fragmento *EcoRI* del gen 18S.

Número de	Genotipo	Fragmentos	Espaciador	Subunidad	
1	chc 6116	3,57	2,9	9	0,67
2	chc 4957 1	3,26	2,9	9	0.36
3	chc 4957 2	3,26	2,6	8,7	0.66
4	chc 4957 3	3,26	2,3	8,4	0.96
6	chc 4956 cultivo	3,26	2,8	8,9	0.46
8	chc 2955 cultivo	3,57	2,9	9	0.67
9	chc 2955 2	3,41	2,8	8,9	0.61
11	chc 5341	3,41	2,8	8,9	0.61
12	chc 7546	no evaluado	2,8	8,9	
13	chc 7546 3	no evaluado	3,7 y 2,8	9,8 y 8,9	
14	chc 7309	3,41	2,8	8,9	0.61
16	chc 4810 80	3,41	3,1	9,2	0.31
17	chc 4810	3,41	2,9	9	0.51
19	cmm 7310	4,04	3,9	10^A	0.14
20	cmm 7313	4,04	3,9	10	0.14
21	cmm 7254	4,04	3,9	10	0.14
22	cmm 7270	4,04	3,9	10 ^A	0.14
23	cmm 7292	4,04	3,9	10	0.14
24	ktz 4937	3,75	3,7	9,8^A	0.05
25	ktz 4946	3,75	3,7	9,8	0.05

Número de	Genotipo	Fragmentos	Espaciador	Subunidad	
26	ktz 4964	3,75	4,4 y 3,7	10,5 y 9,8	
27	ktz 4971	3,75	3,7	9,8	0.05
28	ktz 4986	3,84	3,7	9,8	0.14
29	tar 5889	3,41	3,5	9,6	-0.09
30	tar 5882	3,41	3,5	9,6	-0.09
31	tar 5891	3,41	3,5	9,6	-0.09
32	tar 5633	3,41	2	8,1	1.41
33	spg 6108	4,14	2,9 y 2,4	9 y 8,5	
34	spg 6147	3,75	2,9	9 ^A	0.85
35	spg 4201	3,94 y 3,25	3,3 y 2,6	9,4 y 8,7	0.64y0.
36	mga 3787	3,94	2,9	9	1.04
37	mga 4430	3,94	3,1	9,2	0.84
38	mga 7504	4,84 y 3,75	4 y 3,1	10,1 y 9,2	0.84y0.
39	mcd 6881	3,75	2,6	8,7	1.15
40	mcd 7530	5.12 ^B y 3.49	2,6	8,7 ^A	0.89
41	mcd 7493	3,41	2,6	8,7	0.81
42	mcd 4398	3,57	2,6	8,7 ^A	0.97
43	mcd 7634	3,57	2,6	8,7	0.97
44	vnt 7609	5.12 ^B	2,9	9	
45	vnt 7618B	5.12 ^B	2,9	9 ^A	
46	vnt 7619A	5.12 ^B	2,6	8,7	
47	vnt 7585	5.12 ^B	2,6	8,7	
48	vrn 7614	5.12 ^B	2,6	8,7	
49	vrn 7617	no evaluado	2,9	9	
50	vrn 7586	3,57	2,8	8,9	0.95
51	lfd	3,57	2,6	8,7	0.97
52	grl 4837	3,75	2,6	8,7	1.15
53	grl 4841	no evaluado	2,9	9	
54	grl 5421	3,41	2,6	8,7	0.81
55	grl 7680	3,41	2,8	8,9	0.61
56	grl 3804	3,25	2,3	8,4	0.95
57	opl 5503	3,41	2,3	8,4	1.11
58	opl 5476	3,25	2,3	8,4	0.95
59	opl 3964	3,25	2,8	8,9	0.45
60	opl 5478	3,25	2,8	8,9	0.45
61	acl 4377	3,25	2,5	8,6	0.75
62	acl 5756	3,11	2,5	8,6	0.61
63	acl 4005	3,11	2,5	8,6	0.61
64	acl 7648	3,11	2,8	8,9	0.59
65	adg 799	3,41	2,6	8,7 ^A	0.81
66	adg 668	3,57	3	9,1	0.57
67	adg 557	4,85 y 3,41	2,8	8,9	
68	adg 493	3,41	2,8	8,9	0.61
69	adg 662	3,57	2,9	9	0.67
70	adg 483	3,57	3	9,1	0.57
71	adg 796	3,41	2,8	8,9	0.61
72	adg 7507	3,41	2,6	8,7	0.81
73	Huinkul MAG	3,75	3	9,1	0.75
74	tomate	3,75	3,7	9,8	0.05
75	goniocalyx	3,41	2,8	8,9	0.61
76	verrucosum	3,41	2,6	8,7	0.81
77	phureja	3,41	3	9,1	0.41

Por lo tanto:

a) Con la excepción del sitio del espaciador, los demás, están conservados en todas las especies estudiadas (siempre que el que está ubicado en el 5' del 25S esté sujeto a metilación y no que se haya perdido en algunas subunidades), concordando con Borisjuk *et al* 1993.

b) En *S. venturii* se perdió el sitio *EcoRI* del espaciador cercano a la unidad 17S en todas las subunidades que pudieran integrarla

c) El sitio *EcoRI* ubicado en el extremo 5' del gen 25S de las entradas *S. commersonii* (Oka 7313) y *S. megistacrolobum* (Oka 4430), está en todas las subunidades o bien hay mutaciones en las bases que siguen al sitio impidiendo su metilación, favoreciendo el corte por la enzima.

3.2.2. Polimorfismos de restricción evidenciados con la endonucleasa *DraI*

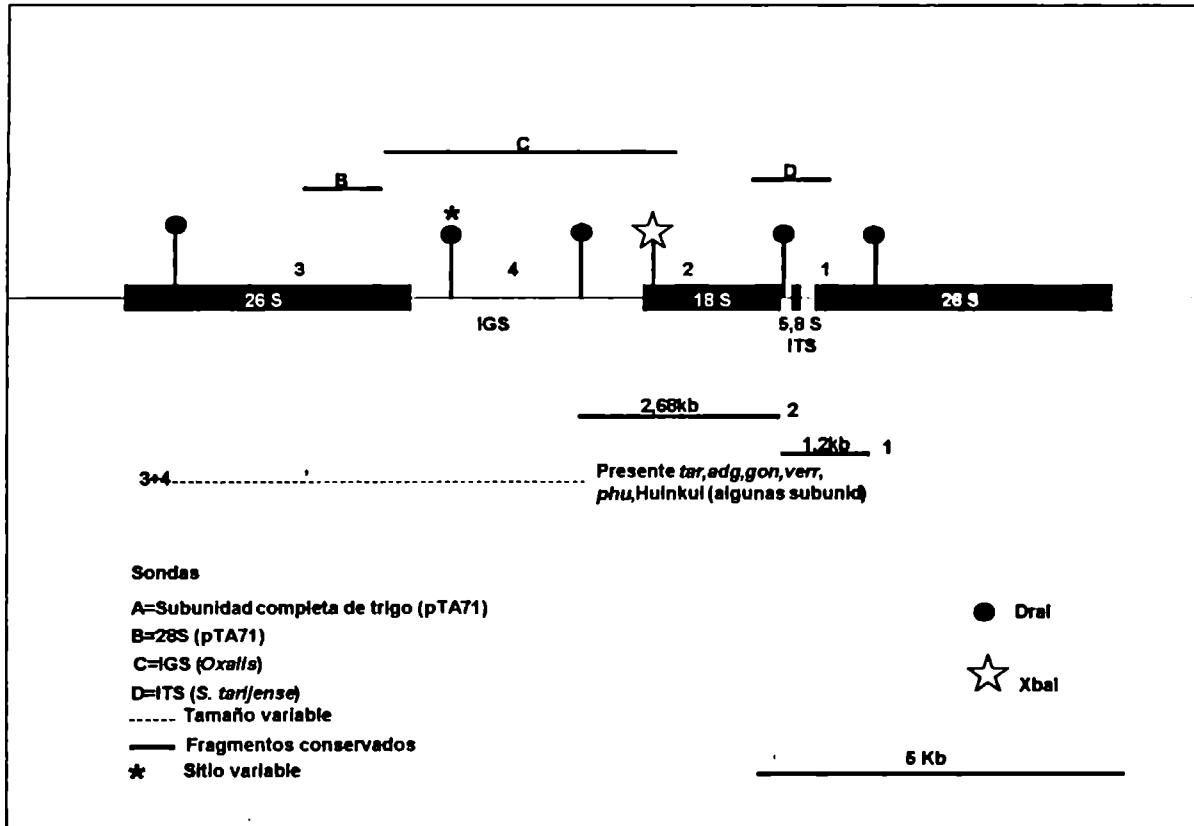
Esta enzima posee al menos un sitio de corte conservado en la región que codifica para el 25S, uno en el espaciador externo y otro en el interno de tomate (Kiss *et al* 1989, Schmidt-Puchta *et al*, 1989) y en papa (Borisjuk *et al* 1993). En las especies analizadas pudo observarse nuevamente la presencia de fragmentos conservados en casi todas ellas (de 1,22 kb (ITS) y 2,68 (17S) kb) y variables de aproximadamente 3-4kb cuando se utilizó la sonda de la subunidad completa de trigo. Según el mapa de restricción citado en Borisjuk *et al* 1993 **Fig. 25**, con esta enzima se generarían 3 fragmentos, 2 de los cuales incluirían al espaciador externo y uno al espaciador interno y el extremo 5' del 25S. Hibridando con la sonda del 25S se comprobó que el fragmento polimórfico corresponde a la porción 5' del espaciador externo, que concuerda con los datos obtenidos con *BglII* antes mencionado, y además evidenciando la presencia de un sitio no descrito aún en el género. Este nuevo sitio, se ubica a aproximadamente a 1,2 kb hacia el extremo 5' del sitio ya descrito en todas las entradas estudiadas por Borisjuk *et al* 1994 que se encuentra hacia el 3' del IGS (las subrepeticiones internas están hacia el 5', ver *BglII*, antes). Pudo observarse también la presencia de fragmentos de mayor tamaño (5,8-6 kb) en algunas de las especies estudiadas: todas las

entradas de *S. tarijense* a excepción de (Oka 5633); *S. gourlayi* (Oka 5421 y Oka 7680); todos los clones de *S. tuberosum* ssp *andigena* (a excepción del clon 483), *S. goniocalyx*, *S. verrucosum* y *S. phureja* (Tabla 21 y Fig. 25), sugiriendo la pérdida de algún sitio interno. La única explicación válida parece ser la pérdida del sitio *Dral* presente en el espaciador externo frente al 25S, generando de esta manera un segmento de aproximadamente 6,7 kb, que no contiene al ITS (Fig. 24).

Mediante hibridación con la sonda ITS, se descartó que se trate del sitio que se encuentra en el extremo 5' de la zona que codifica para la subunidad 17S (que generaría un fragmento de aproximadamente 5,2 kb que sería revelado por la sonda ITS). Al utilizar esta sonda, también se observó que el fragmento de 1,2 kb (constante para todas las entradas) que abarca parte del ITS1 e ITS2, en tomate presentó un tamaño de 1,3kb, probablemente debido al ITS1.

Dado que los fragmentos extras no concuerdan con los datos obtenidos de las sumas de los fragmentos generados, fue necesario hibridar dicha membrana con la sonda ITS, que revela únicamente los fragmentos de 2,7 kb y 1,2 kb. Este último evidenció menor tamaño en tomate, sugiriendo que el ITS1 es de menor longitud que el correspondiente a dicho fragmento altamente conservado en el género *Solanum*, que además se comprobó al amplificar por PCR la zona que abarca a los ITS1 y 2 y al 5,8S (ver más adelante).

Fig. 24: Esquema de los sitios *Dra*I de la subunidad repetitiva de los genes ribosomales de *Solanum*



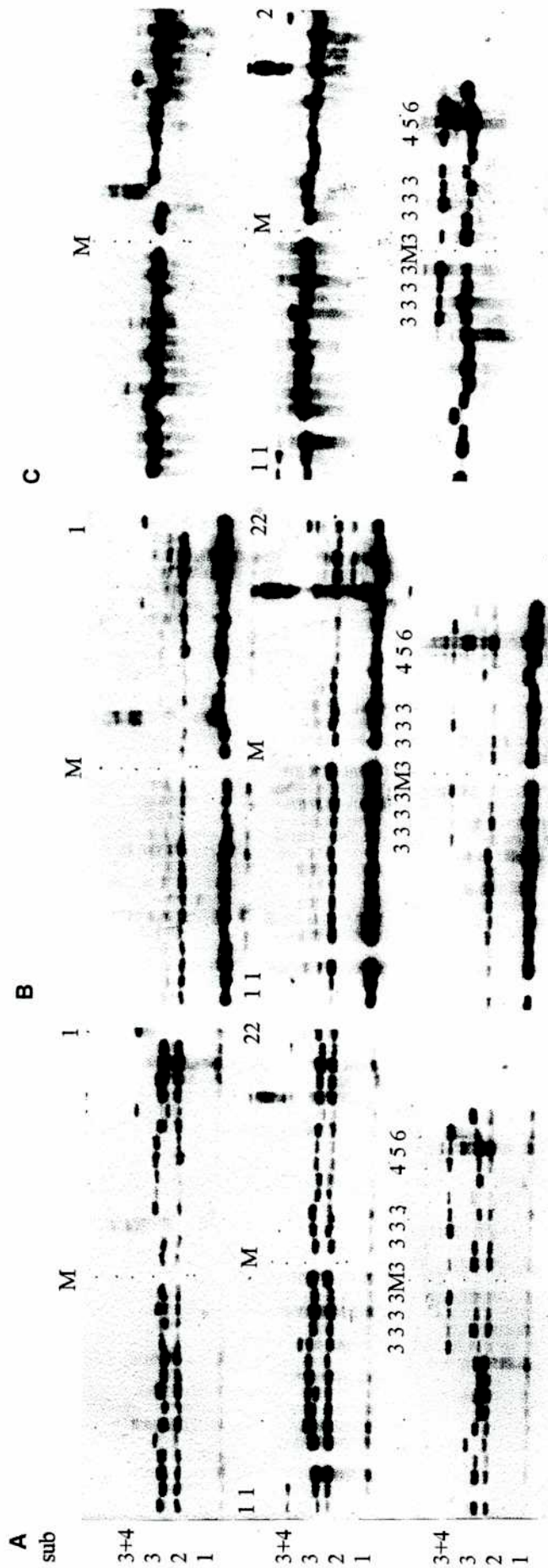


Fig 25: Autorradiografías de las especies estudiadas digeridas con *DraI*. **A,B,C:** Electroforesis durante 12 hs a 1 V/cm de todas las muestras hibridadas con pTA71, ITS, 25S respectivamente. Se observan los fragmentos monomórficos de 1,2 kb(ITS)(excepto tomate), y 2,68 (17S) (según bibliografía y resultados obtenidos) y los polimórficos de 3-4kb (que abarcan al 25S + 5' IGS).). Puede observarse la presencia de fragmentos de 5,8-6 kb en s: todas las entradas de *S. tarjense* (carriles 1) a excepción de (Oka 5633); *S. gourlayi* (Oka 5421 y Oka 7680) (carriles 2); todos los clones de *S. tuberosum* ssp *andigena* y Huinkul MAG(carriles 3) (a excepción del clon 483), *S. goniocalyx* (carril 4), *S. verrucosum*(carril 5) y *S. phureja* (carril 6), sugiriendo la pérdida del sitio *DraI* presente en el espaciador externo frente al 25S.

Tabla 21: Tamaños de los fragmentos de restricción generados por *DraI* e hibridados con la sonda completa de la subunidad de trigo (pTA71) y con el fragmento que abarca una porción del 3' del 25S de trigo.

Número	Genotipo	Fragmentos	Fragmentos	Suma	Subunidad
1	<i>chc 6116</i>	3,94	2,68 y 1,22	7,84	9
2	<i>chc 4957 1</i>	3,57		7,47	9
3	<i>chc 4957 2</i>	3,84 y 3,57		7,74 y 7,47	8,7
4	<i>chc 4957 3</i>	3,66		7,56	8,4
6	<i>chc 4956 cultivado</i>	3,57		7,47	8,9
8	<i>chc 2955 cultivado</i>	3,84 y 3,66		7,74 y 7,56	9
9	<i>chc 2955 2</i>	3,57		7,57	8,9
11	<i>chc 5341</i>	3,75		7,65	8,9
12	<i>chc 7546</i>	3,57 y 3,40		7,56 y 7,30	8,9
13	<i>chc 7546 3</i>	3,75 y 3,48		7,65 y 7,38	9,8 y 8,9
14	<i>chc 7309</i>	3,57		7,47	8,9
16	<i>chc 4810 80</i>	3,66		7,56	9,2
17	<i>chc 4810</i>	3,57		7,47	9
19	<i>cmm 7310</i>	4,14		8,04	10 *
20	<i>cmm 7313</i>	3,94		7,84	10
21	<i>cmm 7254</i>	3,94		7,84	10
22	<i>cmm 7270</i>	4,14		8,04	10 *
23	<i>cmm 7292</i>	3,94		7,84	10
24	<i>ktz 4937</i>	3,75 y 3,48		7,65 y 7,38	9,8 *
25	<i>ktz 4946</i>	3,75 y 3,57		7,65 y 7,47	9,8
26	<i>ktz 4964</i>	3,75 y 3,40		7,65 y 7,30	10,5 y 9,8
27	<i>ktz 4971</i>	3,75 y 3,40		7,65 y 7,30	9,8
28	<i>ktz 4986</i>	3,57		7,47	9,8
29	<i>tar 5889</i>	5,80	sin 2,68	7,02	9,6
30	<i>tar 5882</i>	6,20 y 3,13	2,68 y 1,22		9,6
31	<i>tar 5891</i>	6,60 y 3,47			9,6
32	<i>tar 5633</i>	3,48		7,38	8,1
33	<i>spg 6108</i>	4,30 y 3,65		8,22 y 7,55	9 y 8,5
34	<i>spg 6147</i>	4,14		8,04	9 *
35	<i>spg 4201</i>	4,14 y 3,48		8,04 y 7,38	9,4 y 8,7
36	<i>mga 3787</i>	4,14		8,04	9
37	<i>mga 4430</i>	4,14		8,04	9,2
38	<i>mga 7504</i>	4,84 y 3,75		8,74 y 7,65	10,1 y 9,2
39	<i>mcd 6881</i>	3,75		7,65	8,7
40	<i>mcd 7530</i>	3,65		7,55	8,7 *
41	<i>mcd 7493</i>	3,65		7,55	8,7
42	<i>mcd 4398</i>	3,75		7,65	8,7 *
43	<i>mcd 7634</i>	3,48		7,38	8,7
44	<i>vnt 7609</i>	3,75		7,65	9
45	<i>vnt 7618B</i>	3,75		7,65	9 *
46	<i>vnt 7619A</i>	3,48		7,38	8,7
47	<i>vnt 7585</i>	3,24		7,14	8,7
48	<i>vrn 7614</i>	3,48		7,38	8,7
49	<i>vrn 7617</i>	3,48		7,38	9
50	<i>vrn 7586</i>	3,48		7,38	8,9
51	<i>ifd</i>	(7,12 y 6,20) 3,24			8,7
52	<i>grl 4837</i>	3,13		7,03	8,7
53	<i>grl 4841</i>	3,13		7,03	9
54	<i>grl 5421</i>	6,20 y 3,13			8,7

Número	Genotipo	Fragmentos	Fragmentos	Suma	Subunidad
55	<i>grl 7680</i>	(6,64 y 4,56) 3,24			8,9
56	<i>grl 3804</i>	3,21		7,11	8,4
57	<i>opl 5503</i>				8,4
58	<i>opl 5476</i>	3,21		7,11	8,4
59	<i>opl 3964</i>	3,12		7,02	8,9
60	<i>opl 5478</i>	3,21 y 2,51		7,11 y 6,41	8,9
61	<i>acl 4377</i>	2,90 y 2,63		6,80 y 6,53	8,6
62	<i>acl 5756</i>	2,90 y 2,51		6,80 y 6,41	8,6
63	<i>acl 4005</i>	3,05 y 2,63		6,95 y 6,53	8,6
64	<i>acl 7648</i>	3,21 y 2,63		7,11 y 6,53	8,9
65	<i>adg 799</i>	5,67 y 3,12			8,7 *
66	<i>adg 668</i>	5,67 y 3,37			9,1
67	<i>adg 557</i>	5,67 y 3,37			8,9
68	<i>adg 493</i>	5,67 y 3,37			8,9
69	<i>adg 662</i>	5,67 y 3,55			9
70	<i>adg 483</i>	3,55		7,45	9,1
71	<i>adg 796</i>	5,67			8,9
72	<i>adg 7507</i>	5,67 y 3,21			8,7
73	Huinkul MAG	6,24 y 3,55			9,1
74	tomate	3,37	sin 2,68 y 1,3		9,8
75	<i>gonio</i>	6,24 y 3,57			8,9
76	<i>verrucossum</i>	(7,63 6,24 4,39) 3,37			8,7
77	<i>phureja</i>	5,31 y 3,21			9,1

De la tabla se desprende que hay un fragmento de aprox 1-2 kb que no se detecta y que posiblemente corresponda al IGS, y que por falta de homología con trigo no se manifieste.

3.3 Polimorfismos en el espaciador intragénico

La determinación del polimorfismo de estos fragmentos fue estudiada en profundidad en el caso de hongos (White et al, 1990). Basándose en estos estudios, se diseñaron oligonucleótidos adecuados para amplificar a los espaciadores ITS1 e ITS2 y el gen de 5,8S. Para ello se compararon las secuencias de oligonucleótidos diseñados para hongos con las secuencias de los genes ribosomales descritos en el banco de genes para varias especies vegetales (trigo, cebolla, tomate, poroto) para así estudiar su grado de conservación y la factibilidad de uso para estudios similares en plantas.

La movilidad electroforética de los productos de amplificación se analizó en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio (ver MyM) y los resultados obtenidos se muestran en la Fig. 26 A. En algunas de las muestras se observó la

presencia de 2 bandas con aproximadamente 120 bases de diferencia pero en todos los casos, esta segunda banda (de menor tamaño) no hibridó con la sonda correspondiente (pTA71) por lo que no se consideró entonces para su estudio (**Fig 26 B**). En ninguno de los casos se observó diferencias en el tamaño de dichas bandas (641 pb) , evidenciando un alto grado de conservación de dicho fragmento en todos los individuos y especies estudiados.

Fig. 26 A: Amplificación de los ITS de especies de *Solanum* mediante PCR en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio. Los marcadores de peso molecular se indican con M.1:tar; 2: ktz; 3:Marys Beard; 4: King Edward; 5: Man's Piper; 6:Spunta; 7: Huinkul MAG; 8:Serrana; 9:Baraka; 10,11:Adg; 12: acI; 13: grI4x; 14: opl6x; 15: opl2x; 16,17:chc; 18: vrn; 19: spg; 20: mga; 21:mcd; 22: cmm. P: Prosopis

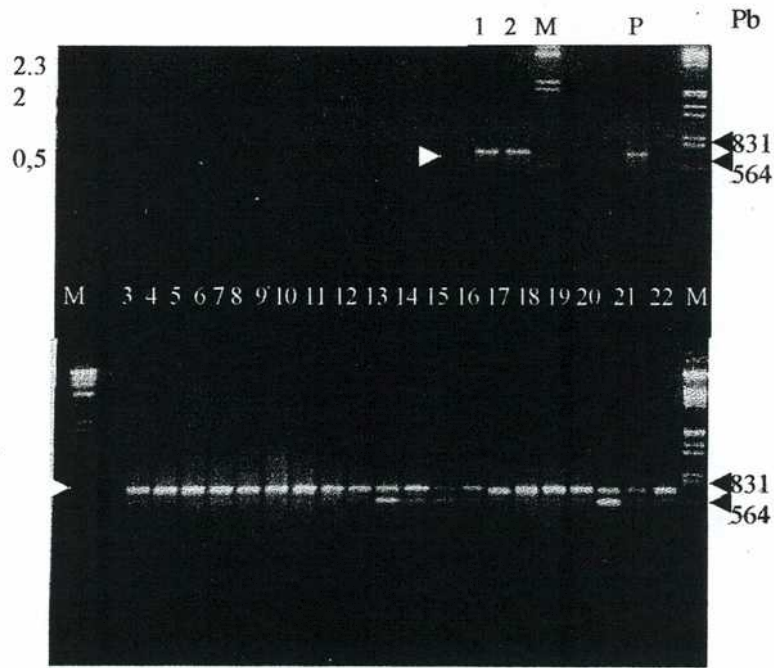
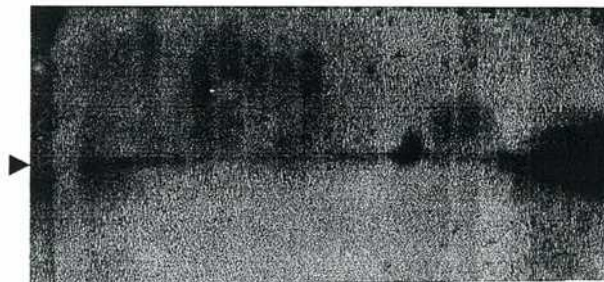


Fig. 26B: Autorradiografía de los ITS hibridada con pTA71. Las flechas indican el fragmento de 641 pb.



4. Análisis y cuantificación de la variabilidad genética en *Solanum* basándose en marcadores moleculares selectivamente neutros

Para la evaluación y caracterización de la variabilidad genética existente en el germoplasma, y para la cuantificación del grado de similitud existente entre las distintas entradas del banco de germoplasma, y obtención de una identificación genotípica específica (documento de identidad genética para su inclusión en la base de datos del banco de germoplasma) para cada entrada se utilizaron diferentes tipos de marcadores moleculares capaces de detectar distintos mecanismos de mutación. Como se explica en la introducción, los RFLP fueron, tradicionalmente, los marcadores más utilizados para estudiar la evolución y mapas comparativos (sintenia evolutiva) en *Solanaceae* y se cuenta con una gran cantidad de sondas públicas ubicadas en los cromosomas respectivos y caracterizadas tanto en la especie de referencia (tomate, *L. esculentum*) como en papa (*S. tuberosum*). Detectan, fundamentalmente, cambios estructurales como son deleciones, inserciones, inversiones, etc. Las sondas utilizadas en este trabajo fueron casi todas "anónimas" por lo que no se sabe si corresponden a genes, aunque aún en este caso, lo más probable es que las variaciones alélicas detectadas correspondan a cambios en secuencias no codificantes (neutras desde el punto de vista selectivo). No se puede descartar que algún *locus* en particular tenga una dinámica evolutiva propia. Los AFLP detectan, fundamentalmente, mutaciones de punto, ya sea en el sitio de reconocimiento de las enzimas *EcoRI* o *MseI* como en cada uno de los 3 nucleótidos diferenciales ubicados en el extremo 3' del primer de amplificación. Los microsatélites detectan mutaciones fundamentalmente causadas por el fenómeno de deslizamiento de la ADN polimerasa en secuencias altamente repetitivas o debidas a entrecruzamiento desigual.

4.1. RFLP

Se eligieron RFLP representativos de una muestra de *loci* dispersa en el genoma. Para ello se usaron 15 sondas caracterizadas y utilizadas previamente para la construcción del mapa comparativo de papa y tomate (ver Materiales y Métodos) y que hibridan con secuencias genómicas de bajo número de copias localizadas en 12 grupos de ligamiento básicos. Se observaron en promedio 20 bandas por genotipo diploide, y 24,1 bandas por genotipo poliploide. Si bien el ANOVA no detectó diferencias significativas entre ambos grupos de citotipos, debido a la gran varianza de los datos (se agruparon números de alelos de distintas especies y además con sistemas reproductivos diferentes y posiblemente evolución diferencial de los genomios que integran a los poliploides), se detectaron en algunos casos mayor número de bandas en las especies poliploides que en las diploides. Esto sugiere que se detectan los homeoalelos, fundamentalmente en *S. tuberosum ssp andígena*. Tabla 22.

Los ADNs de las distintas entradas se digirieron separadamente con las endonucleasas de restricción *EcoRI*, *EcoRV* y *DraI*, se transfirieron a membranas que fueron hibridadas con cada una de las sondas para luego ser lavadas y rehibridadas con la sonda siguiente.

Los ensayos previos con 3 genotipos de papas diploides digeridos con 3 enzimas de restricción de forma independiente (*EcoRI*, *EcoRV* y *BamHI*) e hibridadas con 51 sondas de bajo número de copias de la genoteca de tomate revelaron la siguiente información:

El grado de polimorfismo encontrado por sonda resultó ser alto. Sobre un total de 51 sondas analizadas, los porcentajes encontrados fueron los siguientes:

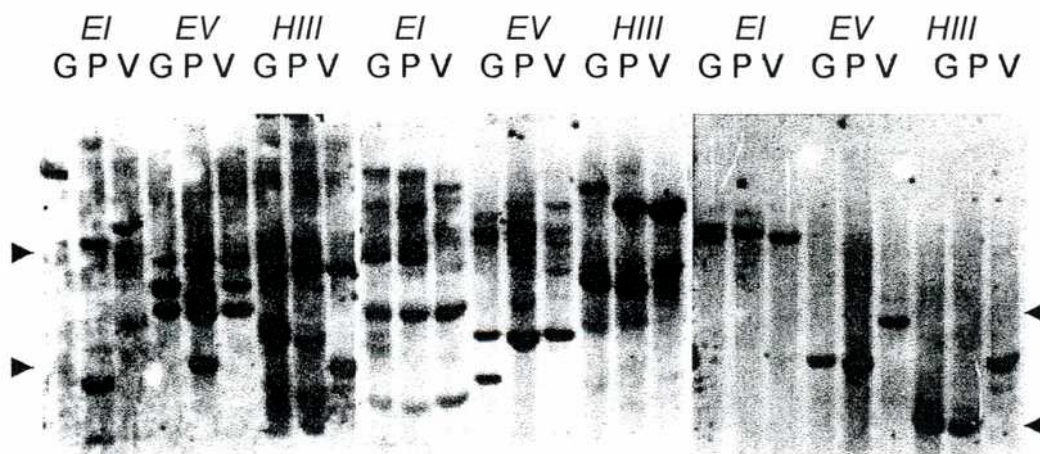
- 10% correspondió a sondas que revelaron bandas monomórficas con las tres enzimas analizadas.
- 24% correspondió a sondas que revelaron polimorfismos con una única enzima.
- 27% correspondió a sondas que revelaron polimorfismos con 2 enzimas.
- 39% correspondió a sondas que revelaron polimorfismos con las 3 enzimas.

La mayoría de las sondas se seleccionó según su distribución en el genoma, según las observaciones recientemente mencionadas y según la

facilidad de su lectura. Todas ellas fueron polimórficas y mostraron un promedio de 4-5 bandas-marcadores polimórficos por sonda. Se detectaron solamente 5 bandas monomórficas en todo el análisis.

Dado que un gran porcentaje (76%) de las sondas evidenció polimorfismos con más de una enzima, esto indica que los RFLP están detectando principalmente rearrreglos del tipo estructural como deleciones, inserciones, translocaciones o inversiones, más que mutaciones de punto que eliminen o generen sitios de restricción. Este fenómeno también está descrito en otros géneros, como en *Sorghum*, *Zea*, (Lijavetzky, 1997 y Lijavetzky, comunicación personal), *Triticum* (Feingold, 1998). A continuación se muestra una autorradiografía que revela los polimorfismos hallados con tres genotipos (*S. goniocalyx*, *S. phureja* y *S. verrucosum*), con tres enzimas de restricción (*EcoRI*, *EcoRV* y *HindIII*).

con tres sondas distintas.



Las 15 sondas, generaron entre 60 y 93 marcadores polimórficos (4-5 marcadores/sonda). En la **Fig. 27**, se muestra a modo de ejemplo, los patrones de todos los genotipos después de la hibridación del DNA genómico de cada entrada (digerido con *DraI*), con la sonda TG510, que fue una de las que reveló mayor grado de polimorfismo.

4.1.1. Construcción de la Matriz Básica de Datos

Las bandas RFLP observadas fueron codificadas como presentes o ausentes en una matriz básica de datos (MBD) (Fig. 28) en donde se registran las Unidades Taxonómicas Operativas (OTUs) en un eje y las variables en el otro. (ver esquema de generación de datos en Materiales y Métodos, Fig. 9). Se utilizó una única combinación de sonda-enzima, para evitar la redundancia de los datos generados.

Fig.27: Autorradiografía de las especies de *Solanum*.

Los ADNs de todos los genotipos fueron digeridos con *DraI*, transferidos a una membrana de nylon e hibridizados con la sonda TG510 marcada con dig-UTP. Se pueden observar las bandas polimórficas M: patrón de ADN del fago Lambda digerido con *HindIII*. A: chc; B: cmm; C: ktz; D:tar; E: spg; F: mga; G: mcd; H vnt; I: vrn; J: ifd; K: gon; L: verr; M: phu; N: grl; O: opl; P: acl; Q: adg; R: Huinkul; S: tomate. *ADN control. Con flechas se indican los distintos marcadores polimórficos

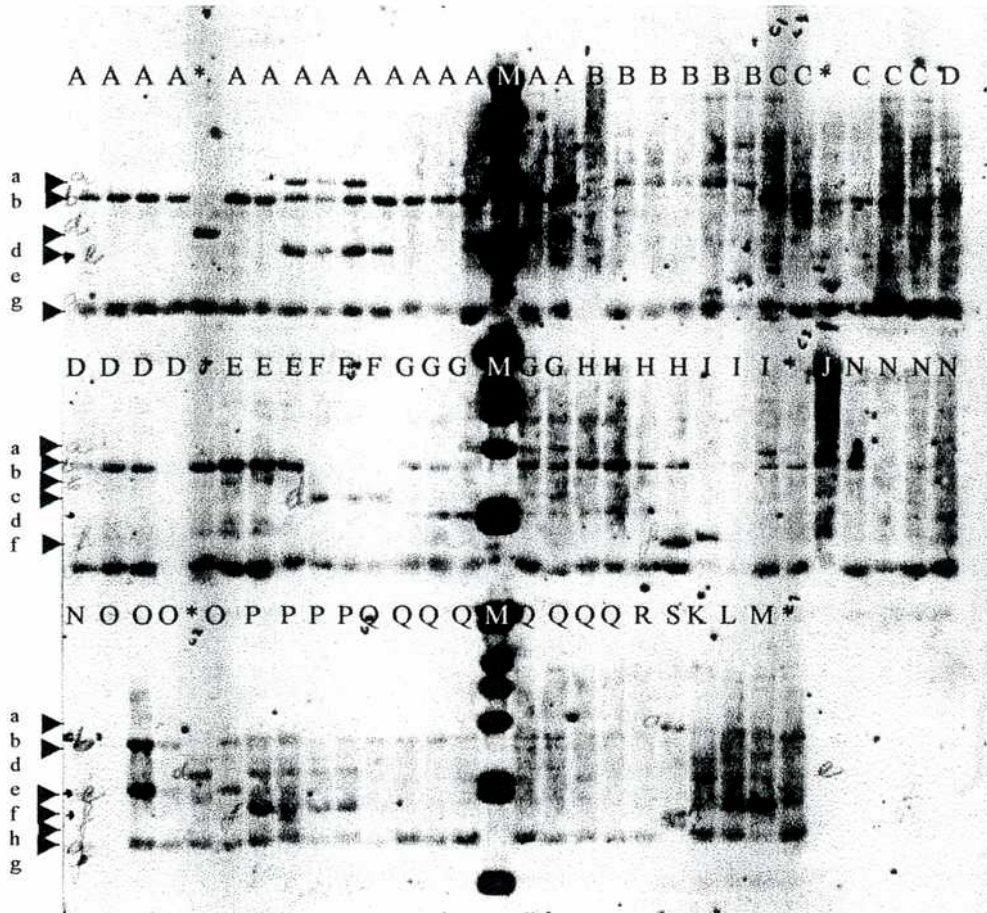


Fig. 28. MBD de RFLPs de todos los genotipos. Se detallan los *loci* que generaron las bandas y también los cromosomas a los que pertenecen. Se especifica, en la primera fila, el nombre de las sondas. En la segunda, el número de variable. En la tercera, el peso molecular de cada variable (banda) en pb. En la primera columna se detallan los OTUs. Los códigos, (1) corresponden a presencia de la banda, (0) ausencia de la banda, (5) dato perdido. En negrita se indican las bandas diagnósticas para las especies analizadas (Tabla de análisis de variables al final).

Sonda	TG479(3)	TG408(10) TG444(6) TG441(5)	TG610(8)	TG 480(2)	TG245(1)	TG473(12) TG674(4)	TG393(11)	TG183(7)	TG404(9)
OTU/VARIAB LE#	12345678	9111111111 012345678	12222222 901234567	2233333333 89012343 123	3333334444 4567890123	444444555555 4567890123456	555666666 789012345	666677777 678901234	7777888 56789012
Peso	76554325	965433322	43322118	75543222	119865433	219876543211	119765532	988654332	98866544
Molecular (pb)	80500220 00000000 00000000	9085862620 0000000000 0000000000	189641520 00000000 00000000	050105321 00000000 00000000	2100508097 0000000000 0000000000 000	0540000355020 044000000000 000000000000 00	500005008 000000000 0000000000 0	082400506 000000000 0000000000 0	05040330 00000000 00000000 0
Chc6116c	01111000	0101000000	001001000	000001000	0101100000	05555555555555	5555555555	5555555555	55555555
Chc4957	01111100	0101000000	001001000	000001000	0001100000	000000100000	110100000	00001110	00000100
Chc49572	11101000	0101000000	001001000	100001000	0001100100	000000100000	110100000	00001110	00000100
Chc49573	55105000	0101000000	001001000	100001000	0001100100	000000100000	110000000	00001110	00000100
Chc4957c	11100100	0101000000	001001000	100001000	0005510100	000000100000	110000000	00001110	00010000
chc5611m	10110100	1001000000	001000000	000011000	555555555555	55555555555555	5555555555	5555555555	5555555555
Chc2955c	01110100	0001000000	011000100	000001000	0001100000	0010000100000	010010000	010001101	00000100
Chc29552	01100100	0001000000	001000100	100001000	0001100000	0000000100000	010010000	000001101	00000100
chc5341m	00100100	0001000000	001000100	000001000	0001100000	0000000100000	010010000	000001101	00000100
Chc7546	555555555	1000000000	001000000	100001000	1555555555	55555555555555	5555555555	5555555555	5555555555
Chc75463	10110100	1000000000	001000000	100001100	155555555555	55555555555555	5555555555	5555555555	5555555555
Chc73091	10105110	0001000000	001000000	110001000	0100101000	0000000001100	110100000	000000110	10001100
Chc48101	10101000	0001000000	001000000	110101000	0001100000	0000000100000	010000000	000001100	00001100
Chc48102	00101000	0001000000	001000000	010101000	0001100000	0000000100000	010000000	000001100	00000100
Cmm7310	10101100	0100000100	010000000	000001000	0000000001	0100000000000	001001000	000100000	00100100
Cmm7313	10101100	0100000000	010000000	000001000	0000000001	0000500100000	000001000	000001000	00100100
Cmm7254	10101100	0100000000	010000000	000001000	0000000001	0000000000010	100001001	000000010	00100100
Cmm7270	10101100	0100000000	010000000	000001000	0000000001	0100000000000	00100101	000000000	00100100
Cmm7292	10501100	0100000100	010000000	000001000	0100100000	0000000000011	010101101	000000000	00100000
Kz4937	00101000	0100000000	001001000	100011000	0100000000	0010510100010	010000110	000011001	00100000
Kz4946	00105000	0100000000	001005000	100001000	0100000000	0000101000000	010000000	000011001	00100000
Kz4964	00101000	0100000000	001001000	100001000	0100000000	0111101000000	010000000	010011000	00100000
Kz4971	10101000	0100000000	001001000	100001000	0100000000	0101010000000	000000110	001011000	00100000
Kz4986	00101000	0100000100	001001000	100001000	0100000000	0100100000000	000000000	000010000	01000000
Tar5889	10100500	0500000000	001000000	100101000	0100100000	0010010000000	010010000	000010000	00000100
Tar5892	10100500	0001000000	001000000	000001000	0100000000	0010000000000	110000000	000010000	00001000
Tar5891	10100500	0001000000	001000000	000001000	0100100000	0000110000000	010010000	000010000	00010101
Tar5633	10100500	0001000001	001000000	100001000	0100100000	0000010000000	010010000	000001000	00000011
Spg6108	00111100	0001000000	001010000	001001000	0100100000	0000010000000	001111100	000101000	00100100
Spg6147	00111000	0100000000	001010000	001001000	0100100000	0000010100000	010000000	000011000	00001000
Spg4201	00101100	0001000000	001000000	010001000	0100100000	0000000100000	000000000	000101000	00100100
Mga3787	00100010	0001000000	000000000	010001000	0100010000	0000000000001	110000000	000101000	00100100
Mga7504	00100000	0001000000	000000000	010001000	0555555555	5000000100000	000000000	000001000	00000100
Mcd6881	00111000	0100000000	001000000	001001000	0100000000	0000000100000	000100000	010001000	10010100
Mcd7530	00111000	0101000000	001000100	100001000	0100000000	0000000100000	000100000	000101000	00010100
Mcd7493	00111000	0100000000	001000100	011001000	0100000000	0000001010000	010100000	000011000	00001100

Med4398	00111000	0100000000	011000000	010010000	0501000000	0000010100000	0101000000	0101000000	010011000	000001010000	0101000000	010011000	001001000
Med7634	00115000	0101000000	011000000	001001000	0100000000	0000010100000	0100000000	0100000000	000001010000	0000010100000	0100000000	001011000	001000000
Vnt7609	00100501	0100000001	001000000	000001000	0001000000	1000010100000	00000100000	0000010000	000011000	00000100000	0000010000	000011000	010000000
Vnt7618	00100101	1100000001	001000000	000001000	0000000000	1000000100000	00000000000	0000000000	0000000000	1000000100000	0000010000	000001000	000001000
Vnt7619a	00100101	0011000001	001000000	000001000	0000000000	1000000100010	00000000000	0000000000	0000010000	1000000100010	0101010000	000101000	000001000
Vnt7585	00100101	0010000000	001000000	000001000	0000000000	1000010100000	00000100000	0000000000	0000010000	00000100000	0001000000	000101000	055555555
Vnt7617	00110110	55555555555	5050000000	000001000	05555555555	0000010100000	00000100000	0000000000	05555555555	55555555555	55555555555	5555555555	5555555555
lfd	10101000	0100000000	0555555555	000000100	0000000000	00000000000	0000000000	0000000000	01001100000	00000000000	0100000000	000110000	001010000
Gonioca	50505010	0100010001	000000100	000000000	0000000000	00000000000	0000000000	0000000000	0100101000	0001110000000	0100000000	000100000	001010000
Verruco	11151000	0001000000	011000050	000100000	0000000000	011000050	0000000000	000100000	0110000000	0000010000010	110100100	000011001	010100000
Phureja	11101010	1000000000	101000010	000000000	0000000000	101000010	0000000000	0000000000	0100110000	0001000100000	000100100	000011001	001001000
Grl4837	00001000	0001000001	001000000	000010000	0000000000	001000000	0000000000	000010000	0101000000	0000010100000	0100000000	000001000	001001000
Grl5421	00111500	0001000005	501000000	000000000	0000000000	501000000	0000000000	0000000000	0101000000	0000000100000	0101000000	000001001	000001000
Grl5804	00111500	0001000005	001010000	000010000	000010000	001010000	000010000	000010000	0101100000	0010010100000	0101000000	000001000	000101010
Opl3964	50111500	1001100000	001000100	000010000	0000000000	001000100	0000000000	0000000000	0100110000	0000000500000	110101100	111010000	000001000
Opl5476	00111000	0501000000	001000100	000000000	0000000000	001000100	0000000000	0000000000	0101100000	0000000100000	0101000000	000001000	000001000
Opl5478	00111000	0501000000	001000100	000000000	0000000000	001000100	0000000000	0000000000	0101100000	0000000100000	0101000000	000001000	000001000
AcI4377	10101100	0101000001	001105050	000001000	0000000000	001105050	000001000	000001000	0100110000	0000000100000	0101000000	000001000	000001000
AcI5756	10101000	0101000001	001000010	000001000	0000000000	001000010	000001000	000001000	1110100000	0000010100000	0100000000	000001000	000100000
AcI4006	10101000	0101000001	001000010	000001000	0000000000	001000010	000001000	000001000	1100100000	0000000100000	0100000000	000001000	000100000
AcI7648	00101100	0101000000	101000010	000001000	0000000000	101000010	0000000000	000001000	1100100000	0000000100000	0100000000	000001000	000100000
Adg799	00100110	1001000001	001000000	000011010	0000000000	001000000	000001010	000001000	0100100000	0000000100000	010100100	011001000	000000100
Adg668	00100110	0101000111	001000000	000011011	0010000000	001000000	000011011	000011011	0100110000	0000000100000	0101000000	100001000	000001000
Adg557	00110010	0101000001	001010000	000010011	001010000	001010000	000010011	000010011	0100110000	0000010100000	1101000000	110000001	000001000
Adg493	00100100	0101000001	001000000	000011011	0010000000	001000000	000011011	000011011	0101110000	0000000100010	0101000000	001001000	000001000
Adg662	00100110	0100010001	001000000	000011010	0010000000	001000100	000011010	000011010	0100110000	0000000100000	0101000000	000001000	000001000
Adg483	00110110	1100010001	001000000	000011010	0010000000	001000100	000011010	000011010	0101100000	0000000100010	0100010000	001001000	000001000
Adg796	00111100	0101000001	001000000	000011000	0010000000	001000100	000011000	000011000	0101100000	0000000100000	0001000000	001001000	000001000
Adg7507	00111100	0101000001	001000000	000011000	0010000000	001000000	000011000	000011000	0101100000	0000000100000	0000000000	001001000	000001000
Huinkul	00110010	0100000000	001000000	000001000	0010000000	001000000	000001000	000001000	05555555555	5000000100000	05555555555	500005001	000000000
tomate	11010000	0100001010	000110001	001010000	0000000010	000110001	001010000	001010000	0000000010	0010000000010	0100100000	011000000	000000100

4.1.2. Número de alelos presentes en las entradas

Como puede observarse en la **tabla 22**, un gran número de entradas (45% de los datos de todo el grupo) resultaron con una única banda (resaltadas en negrita). Se calculó el grado de homocigosis mínimo a partir de estos datos, para las especies diploides estimándose que el mismo fue de 47,9%; 33,7% y de 31% para los citotipos diploides, tetraploides y hexaploides respectivamente. Este resultado (que los poliploides en su conjunto posean menor porcentaje relativo de homocigosis) no es el esperado, considerando el tipo de reproducción que poseen estas especies, que son fundamentalmente autógamas. Sin embargo este cálculo adolece de algunos errores debido a que se están evaluando bandas (ya que no se cuenta con ensayos de progenies para determinar el estado de los *loci*) y en caso de detectarse homeoalelos, que pueden estar en homocigosis, no se computan, por lo tanto se subestiman enormemente estos datos en las ploidías superiores a 2. Debido a que fueron analizados 15 *loci*, éstos pueden no ser suficientemente representativos del comportamiento del total del genoma. Además, la precisión de la estimación es distinta según el grupo siendo mayor en el caso de los diploides, ya que en los poliploides, la contabilización de los homeoalelos disminuye el valor calculado dado que se considera heterocigosis a variaciones debidas al mismo *locus* cuando son debidas a *loci* ubicados en los cromosomas homeólogos.

Tabla 22. Detalle del número de alelos de cada OTU con las distintas sondas. En la primera fila se describen los nombres de los loci (sondas TG). En cada columna se indica el número de alelos observados. En las últimas cinco columnas se indican: el total de loci homocigotas encontrados; el número de loci que no tuvieron alelos nulos; el porcentaje de loci "homocigotas" (descontando los loci que dieron alelos nulos); el porcentaje respecto de los 15 loci y el número total de bandas. En negrita se distinguen los loci homocigotas.

	479(3)	482(10)	408(10)	444(6)	441(5)	510(6)	574(4)	460(2)	245(1)	473(12)	482(6)	393(11)	183(7)	419(5)	404(9)	Alel hom	Nro loci no nulo	% hom1	% hom2	Band tot
Chc6116c	4	1	2	1	2	1	1	1	3	0	0	0	0	0	0	5	9	56	33	16
Chc4957	5	1	2	1	2	1	1	1	2	0	1	3	0	3	1	7	13	54	47	24
Chc49572	4	1	2	1	2	1	1	2	3	0	1	3	0	3	1	6	13	46	40	25
Chc49573	1	1	2	1	2	1	1	2	3	0	1	2	0	3	1	7	13	54	47	21
Chc4957c	4	1	2	1	2	1	1	2	2	0	1	2	1	3	1	7	14	50	47	24
chc5611m	4	1	2	1	2	1	1	2	0	0	0	0	0	0	0	4	8	50	27	14
Chc2955c	4	2	2	1	1	2	1	1	2	1	1	2	1	3	1	8	15	53	53	25
Chc29552	3	2	2	1	1	2	1	3	2	0	1	2	0	3	1	5	13	38	33	24
chc5341m	2	1	1	1	1	2	1	2	2	1	1	2	1	2	2	8	15	53	53	22
Chc7546	0	1	2	1	1	1	1	2	1	0	0	0	0	0	0	6	8	75	40	10
Chc75463	4	1	2	1	1	1	1	3	1	0	0	0	0	0	0	6	9	67	40	15
Chc73091	4	1	1	1	1	1	1	3	3	0	2	3	0	2	3	6	13	46	40	26
Chc48101	3	1	2	0	1	1	1	4	2	0	1	1	0	2	2	6	12	50	40	21
Chc48102	2	1	2	0	1	1	1	3	2	0	1	1	0	2	1	7	12	58	47	18
Cmm7310	4	1	2	0	0	1	1	1	1	1	0	2	1	0	2	7	11	64	47	17
Cmm7313	4	1	2	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	2	9	12	75	60	17
Cmm7254	4	1	2	0	1	1	1	1	1	0	1	3	0	1	2	8	12	67	53	19
Cmm7270	4	1	2	0	1	1	1	1	2	1	1	3	1	0	2	8	13	62	53	21
Cmm7292	3	1	2	0	1	1	1	1	3	0	2	5	0	0	1	6	11	55	40	21
Klz4937	2	1	2	1	1	1	1	3	1	2	2	3	0	3	1	7	14	50	47	24
Klz4946	1	1	3	1	2	1	1	2	1	2	0	1	0	3	1	8	13	62	53	20
Klz4964	2	1	2	1	1	1	1	2	1	5	0	1	1	2	1	9	14	64	60	22
Klz4971	3	1	2	1	1	1	1	2	1	4	0	2	1	2	1	8	14	57	53	23
Klz4986	2	1	2	1	1	1	1	2	1	2	0	0	0	1	1	8	12	67	53	16
Tar5889	2	1	2	1	2	1	1	3	2	2	0	2	0	1	1	6	13	46	40	21
Tar5882	2	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	2	0	1	2	9	12	75	60	15
Tar5891	2	1	2	1	1	1	1	1	2	2	0	2	0	1	3	6	13	46	40	21
Tar5633	3	1	2	2	1	1	1	2	2	1	0	0	0	1	2	6	12	50	40	19
Spg6108	4	1	2	2	1	2	1	2	2	1	0	5	1	1	2	6	14	43	40	27
Spg6147	3	1	2	1	1	2	1	2	2	1	1	1	0	2	1	8	14	57	53	21
Spg4201	3	1	2	2	1	1	1	2	2	0	1	2	1	1	3	7	14	50	47	23
Mga3787	2	1	2	2	1	1	1	2	2	1	1	2	1	1	2	8	15	53	53	22
Mga7504	1	1	2	2	1	1	0	2	0	0	1	0	0	1	1	7	10	70	47	13

	479(3)	482(10)	408(10)	444(6)	441(5)	510(8)	574(4)	480(2)	245(1)	473(12)	482(6)	393(11)	183(7)	419(5)	404(9)	Alel hom	Nro loci no nulo	% hom1	% hom2	Band tot
Mcd6881	3	1	2	1	1	1	1	2	1	0	1	1	1	1	3	10	14	71	67	20
Mcd7530	3	1	2	2	2	1	1	1	1	0	1	1	1	1	2	7	14	50	47	22
Mcd7493	3	2	2	1	1	2	1	3	1	1	1	2	0	2	2	6	14	43	40	24
Mcd4398	3	2	2	1	1	1	1	3	1	1	1	2	1	2	2	8	15	53	53	24
Mcd7634	2	2	2	2	2	1	1	2	1	1	1	1	1	2	1	8	15	53	53	22
Vnt7609	2	1	2	1	1	1	1	1	1	2	1	2	0	2	1	9	14	64	60	19
Vnt7618	3	1	2	2	1	1	1	1	0	1	1	2	0	1	1	9	13	69	60	18
Vnt7619a	3	1	2	2	2	1	1	1	0	1	2	3	1	1	1	8	14	57	53	22
Vnt7585	3	1	1	1	1	2	1	1	2	2	1	1	1	1	0	10	14	71	67	19
Vnt7617	4	0	2	2	1	2	4	1	0	0	0	0	0	0	0	2	7	29	13	16
lfd	3	1	0	1	1	1	2	1	2	1	1	1	0	2	2	8	13	62	53	19
Gonioca	1	1	1	1	1	1	1	0	3	3	0	1	1	1	2	10	13	77	67	18
Verruco	4	1	3	2	1	2	2	1	2	1	1	4	0	3	2	5	14	36	33	29
Phureja	5	1	2	2	2	2	2	0	3	1	1	2	1	1	2	6	14	43	40	26
Grl4837	1	2	3	1	1	2	1	1	2	1	1	1	0	1	1	10	14	71	67	19
Grl5421	3	1	1	2	0	1	1	0	2	0	1	2	0	1	2	6	11	55	40	17
Grl3804	3	1	1	2	1	0	1	1	3	2	6	2	0	1	3	6	13	46	40	27
Opl5476	3	1	2	2	3	2	2	1	3	0		5	4	1	1	4	13	31	27	30
Opl3964	3	1	2	2	1	2	1	0	1	0	1	2	0	1	2	6	12	50	40	19
Opl5478	3	1	2	2	1	2	2	0	3	0	1	3	0	1	2	4	12	33	27	23
AcI4377	4	2	2	2	2	2	1	1	3	0	0	1	1	1	1	6	13	46	40	23
AcI5756	3	2	2	2	2	2	1	1	4	1	1	1	0	2	1	6	14	43	40	25
AcI4005	3	2	2	2	2	2	1	1	3	0	1	1	0	1	1	6	13	46	40	22
AcI7648	3	2	2	2	2	2	1	1	3	0	1	3	2	1	1	4	14	29	27	26
Adg799	3	1	3	2	3	1	1	3	2	1	1	3	2	1	1	7	15	47	47	28
Adg668	3	2	3	3	2	1	1	4	3	0	1	2	1	1	1	6	14	43	40	28
Adg557	3	1	3	3	3	1	2	3	3	1	1	3	2	1	1	6	15	40	40	31
Adg493	2	2	3	3	3	1	2	4	4	0	1	2	1	1	1	5	14	36	33	30
Adg662	3	2	3	2	2	2	1	2	3	0	1	2	0	1	1	4	13	31	27	25
Adg483	4	1	3	2	2	1	1	3	3	0	1	2	1	1	1	7	14	50	47	26
Adg796	4	2	3	2	2	2	2	2	3	0	2	1	1	1	1	4	14	29	27	28
Adg7507	4	1	3	1	2	1	1	2	3	0	1	0	1	1	1	8	13	62	53	22
Huinkul	3	1	3	1	1	1	1	1	0	0	2	0	0	1	0	7	10	70	47	15
tomate	3	1	1	1	1	4	2	2	1	1	2	2	0	0	1	7	13	54	47	22

4.1.3. Índices de contenido polimórfico de cada sonda de RFLP.

El grado de polimorfismo capaz de detectar un marcador molecular determinado, está dado por la fórmula que se describe en Materiales y Métodos:

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

Se calcula para cada locus la frecuencia (p_i) de cada alelo en todos los genotipos.

Se considera que los marcadores más informativos son aquellos que, entre otras propiedades, poseen un alto valor de PIC, lo que se asume como una medida de la capacidad de detectar la variabilidad en la muestra. Sin embargo, esta afirmación debe analizarse con cuidado dado que existen una serie de elementos condicionantes. Uno de los condicionantes es que los valores absolutos no son directamente comparables entre diferentes especies porque se corre el riesgo de ignorar la influencia de las diferentes modalidades reproductivas (autogamia, reproducción clonal, etc.), por ejemplo. En este contexto, los valores tomados globalmente pueden adolecer de errores dado que se trata de un grupo de especies heterogéneas. Por otro lado, se pueden cometer errores de falta de independencia al asumir que cada banda pertenece a un *locus* diferente, y eso no siempre es cierto, particularmente cuando hay más de dos bandas que hibridan con la misma sonda ya que las bandas generadas por una sonda suelen estar adyacentes en el ADN de un mismo cromosoma (ver fig. 4). Asumiendo estos errores, se calcularon los PIC para cada sonda en particular agrupando las especies según los niveles de ploidía. En la tabla 23, se puede apreciar, que los valores oscilaron desde 0,04 (TG 574) hasta 0,98 (TG 510) para los citotipos diploides, y de 0,03 (TG 245) a 0,93 (TG 473) en los poliploides, evidenciando *loci* muy polimórficos y otros con menor grado de polimorfismo.

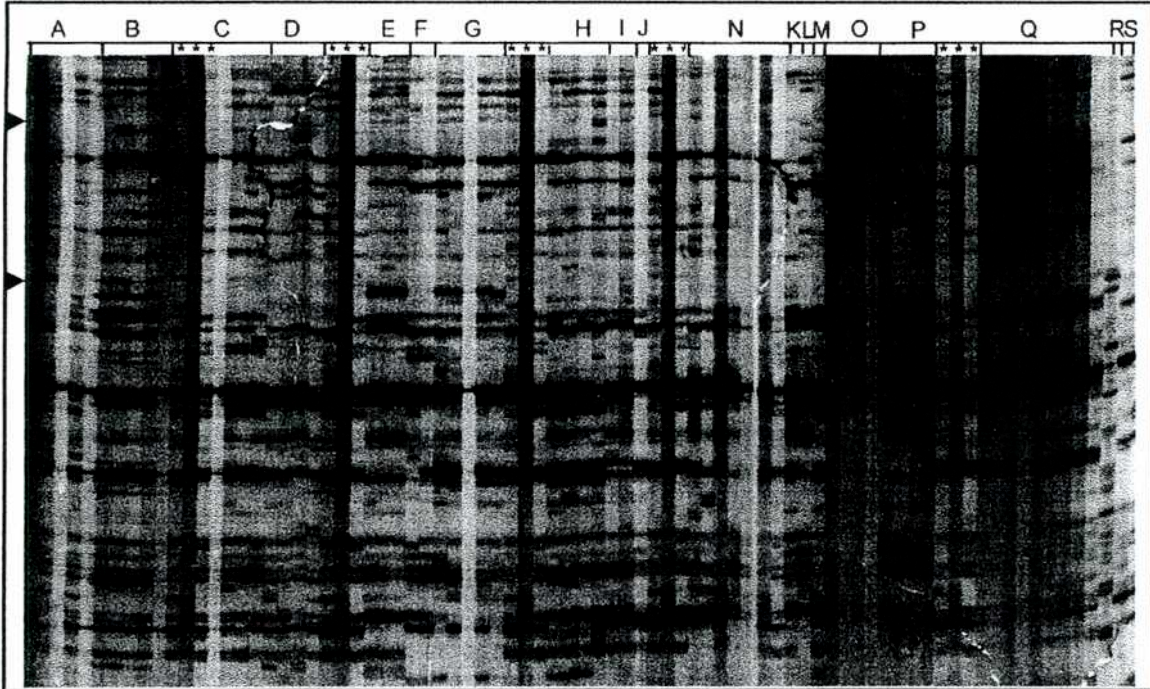
Tabla 23: Estimación del Índice de Contenido Polimórfico de cada sonda de RFLP. En la primera columna se indican las sondas evaluadas, en la segunda, el valor de PIC de los citotipos diploides y en la tercera, el valor de PIC de los citotipos poliploides. En la penúltima fila se indica el promedio y las desviaciones estándar de los valores de PIC de las sondas evaluadas y en la última el valor de PIC promedio y desviaciones estándar de todas las bandas, calculado suponiendo que cada una de ellas fuese un locus.

sonda	PIC 2x	PIC Poliploides
tg479	0,320	0,062
tg482	0,29	0,87
tg510	0,98	0,88
tg574	0,04	0,87
tg441	0,46	0,84
tg444	0,29	0,81
tg408	0,69	0,74
tg479	0,32	0,06
its	0,94	0,67
tg245	0,39	0,03
tg473	0,39	0,93
tg393	0,43	0,04
tg183	0,13	0,004
tg404	0,44	0,46
Promedio y desv. std	0,44 ±0,268	0,52±0,388
Total	0,24±0,149	0,27±0,136

4.2. AFLP

Con las 4 combinaciones de primers *EcoRI/MseI* con tres nucleótidos selectivos (+3) utilizadas (ver Materiales y Métodos) se obtuvieron 251 bandas (62 bandas en promedio por combinación de "primer") considerando a todos los individuos independientemente del nivel de ploidía. Las mismas fueron evaluadas como 251/*loci* sin considerar posibles alelismos, a pesar de que estos no pueden ser descartados. Todas las combinaciones produjeron marcadores polimórficos (entre todos los individuos). Como testigos de las corridas electroforéticas y para una buena evaluación de las bandas, se repitieron 3 individuos cada 10 o 15 calles. Se incluyeron en el análisis todas las bandas existentes, monomórficas y polimórficas, reflejando más realmente la variabilidad relativa existente entre los genomas (Fig. 29).

Fig. 29: Gel de AFLP de las especies analizadas teñido con nitrato de plata, se muestra el patrón de bandas generado mediante la combinación de primers E32M32. Se indican bandas características de la especie *S. commersonii*. A: chc; B: cmm, C: ktz; D: tar; E: spg; F: mga; G: mcd; H: vnt; I: vrn; J: ifd; K: gon; L: verr; M: phu; N: gri; O: opl; P: acl; Q: adg; R: Huinkul y S: tomate.



4.2.1. Construcción de la Matriz Básica de Datos

Las bandas AFLP observadas fueron codificadas como presentes o ausentes en una matriz básica de datos (MBD) (Fig. 30) en donde se registran las Unidades Taxonómicas Operativas (OTUs) en un eje y las variables en el otro.

Adg 483
Adg 796
Adg 7507
Huinkul
tomate

5011011100010
5011011111010
5011011111010
5011011111010
50001001001100

0000101011000110010551105000000011001100000101100011000
00001010110005100101511050100000110011000000101100011000
0000101011000110010151105010000011001100000101100011000
0001101011101100101511055555555555555555155150015555
01001010001011001015010655555555555155555555550015555

100011001001551101000000100001510100050015550151500101111
000011001001551101000000100001110100010015550151500101111
000101001001551101000000100001110100010015150151500101111
150501501001551101000100101110100010015150111500101111
15061010501155000001110010010110010000005050011500011111

4.2.2. Número de *loci* polimórficos por entrada

En la **Tabla 24** se indica el número de bandas presentes (computadas como alelos dominantes) para cada uno de los 251 *loci* evaluados con cada combinación de oligonucleótidos selectivos +3. Si bien el número total de *loci* evaluados fue de 251; el número de bandas visibles para cada entrada fue de 75 por genotipo (en promedio). No se observaron diferencias significativas entre el número de bandas presentes en los genotipos diploides y los poliploides, fenómeno inesperado ya que se supone que este parámetro está íntimamente asociado al tamaño del genoma. Por el contrario, el promedio de bandas de los genotipos diploides fue de $81,8 \pm 16,48$ y el de los poliploides fue de $58,2 \pm 25,72$ bandas por genotipo (para evitar errores en estos cálculos se eliminaron los datos de las combinaciones de oligonucleótidos que tuvieran más de un 10% de datos perdidos). Estos resultados podrían estar indicando:

- a) que los genomas de los cromosomas homeólogos no serían lo suficientemente distintos entre sí como para generar bandeos diferenciales, evidenciando una reciente historia evolutiva;
- b) que en los genotipos diploides tienen una extensa historia evolutiva con aparición de variantes específicas reflejadas por numerosas bandas únicas (en la tabla 44-45 anal de variables AFLP) se observan al menos 21 bandas únicas para los genotipos diploides mientras que sólo hay 5 para los poliploides).

Tabla 24. Número de bandas de cada genotipo por combinación de oligonucleótidos selectivos +3 de AFLP. En la primera fila se indica el número de *loci* de cada combinación, en la segunda el nombre de los oligonucleótidos +3 utilizados. En la primera columna se detallan las entradas analizadas y en la última el total de bandas por genotipo. En negrita se resaltan los genotipos que tuvieron más de un 10% de datos perdidos en algunas de las combinaciones de oligonucleótidos ensayados.

Nro de <i>loci</i>	60	79	54	100	251
Comb	e32m31	e32m32	e38m42	e43m37	total
<i>Chc6116</i>	17	33	14	24	88
<i>Chc49571</i>	17	40	17	26	100
<i>Chc49572</i>	17	41	16	26	100
<i>Chc49573</i>	18	41	16	25	100
<i>Chc4957c</i>	18	43	16	25	102
<i>Chc5611m</i>	20	26	13	25	84
<i>Chc2955c</i>	18	30	11	23	82
<i>Chc29552</i>	14	20	8	15	57
<i>Chc5341m</i>	18	24	6	7	55
<i>Chc7546</i>	15	26	11	27	79
<i>Chc75463</i>	16	30	10	10	66
<i>Chc73091</i>	19	24	16	21	80
<i>Chc48108</i>	6	1	1	3	11
<i>Chc4810</i>	13	33	12	25	83
<i>Cmm7310</i>	17	31	16	31	95
<i>Cmm7313</i>	17	33	19	30	99
<i>Cmm7254</i>	16	38	19	30	103
<i>Cmm7270</i>	16	31	19	30	96
<i>Cmm7292</i>	16	34	8	6	64
<i>Ktz4937</i>	16	35	7	4	62
<i>Ktz4946</i>	17	34	14	27	92
<i>Ktz4964</i>	17	37	16	26	96
<i>Ktz4971</i>	17	40	19	27	103
<i>Ktz4986</i>	19	34	14	24	91
<i>Tar5889</i>	16	29	15	26	86
<i>Tar5882</i>	12	27	17	22	78
<i>Tar5891</i>	13	40	16	25	94
<i>Tar5633</i>	14	33	14	24	85
<i>Spg6108</i>	14	28	16	27	85
<i>Spg6147</i>	17	27	15	27	86
<i>Spg4201</i>	15	30	15	25	85
<i>Mga3787</i>	8	31	15	22	76
<i>Mga7504</i>	8	25	17	20	70
<i>Mcd6881</i>	14	32	15	24	85
<i>Mcd7530</i>	14	29	15	27	85
<i>Mcd7493</i>	13	25	9	5	52
<i>Mcd4398</i>	13	29	18	27	87
<i>Mcd7634</i>	13	26	19	23	81
<i>Vnt7609</i>	15	22	16	24	77
<i>Vnt7618b</i>	18	21	17	24	80
<i>Vnt7619a</i>	18	19	15	25	77
<i>Vnt7585</i>	19	27	16	27	89
<i>Vm7617</i>	16	25	17	26	84
<i>lfd</i>	13	28	9	18	68

Nro de loci	60	79	54	100	251
Comb	e32m31	e32m32	e38m42	e43m37	total
<i>Gonio</i>	22	25	16	26	89
<i>Verru</i>	13	30	11	22	76
<i>Phur</i>	23	25	21	27	96
<i>Grl4837</i>	11	27	8	25	71
<i>Grl5421</i>	13	20	9	18	60
<i>Grl3804</i>	11	10	3	7	31
<i>Opl5476</i>	8	16	3	4	31
<i>Opl3964</i>	7	17	8	5	37
<i>Opl5478</i>	7	11	2	3	23
<i>Acl4377</i>	10	23	17	13	63
<i>Acl5756</i>	14	29	17	19	79
<i>Acl4005</i>	11	23	17	17	68
<i>Acl7648</i>	12	24	17	18	71
<i>Adg799</i>	12	23	21	17	73
<i>Adg668</i>	13	12	14	11	50
<i>Adg557</i>	12	9	12	12	45
<i>Adg493</i>	12	10	6	4	32
<i>Adg662</i>	12	16	12	16	56
<i>Adg483</i>	23	27	18	20	88
<i>Adg796</i>	20	33	19	21	93
<i>Adg7507</i>	23	33	20	22	98
<i>Huinkul</i>	23	39	16	25	103
<i>Tomate</i>	10	27	12	20	69

4.2.3. Índice de contenido polimórfico promedio por combinación de oligonucleótidos selectivos

Se calculó el índice de contenido polimórfico promedio por combinación de oligonucleótido selectivo +3 para los citotipos diploides y poliploides. Se consideraron en este caso únicamente las bandas polimórficas. En la **tabla 25** se describen los valores calculados y sus desviaciones estándar. No se observaron diferencias significativas entre los distintos citotipos. Los valores descriptos de 0,3 para estos análisis resultaron comparables a los obtenidos en cultivares de papa y especies de soja (Milbourne et al, 1997, Powell et al 1996) pero superiores a los obtenidos en variedades de soja cultivada (Giancola, 1998).

Tabla 25: Índices de contenido polimórfico promedio de las distintas combinaciones de oligonucleótidos selectivos +3 de AFLP. En la última fila se indica el valor promedio de las cuatro combinaciones utilizadas y su desvío estándar.

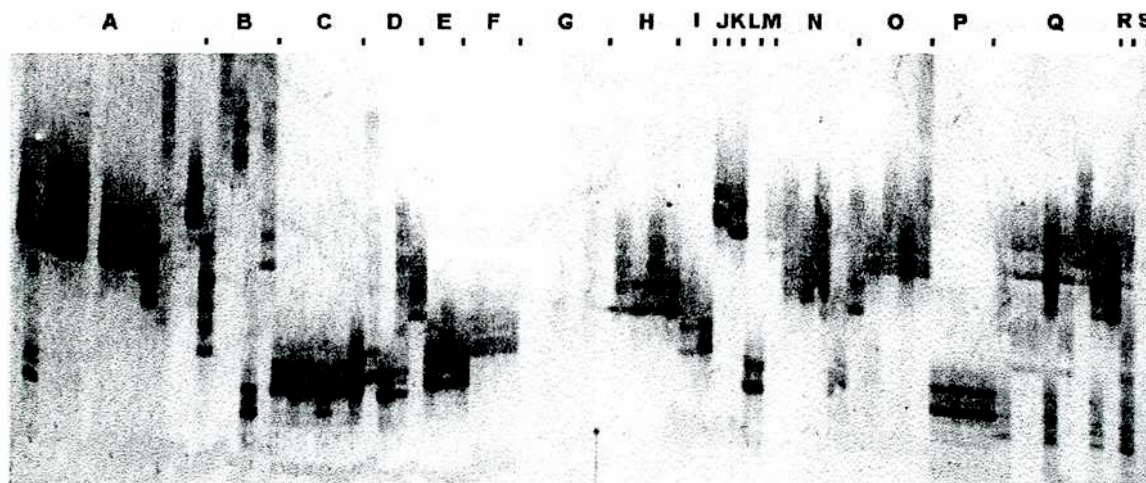
Comb. de primer	2x	4x
e31m32	0,304 ±0,130	0,296 ±0,143
e32m32	0,342 ±0,144	0,306 ±0,140
e38m42	0,276 ±0,143	0,356 ±0,128
e43m37	0,279 ±0,143	0,303 ±0,147
Promedio	0,300±0,03	0,334±0,02

4.3. MICROSATELITES

Se analizaron 7 microsatélites que fueron desarrollados por el SCRI (Scottish Crop Research Institute) y su secuencia aún no está publicada. Si bien el número de combinaciones de oligonucleótidos fue, como se menciona, de 7, el número total de *loci* analizados fue mayor porque, en algunos de los casos hubo combinaciones que fueron capaces de amplificar más de un locus genómico (multilocus).

En la **Fig. 31**, se muestra a modo de ejemplo, los patrones de todas las entradas de papa obtenidos del estudio del locus SO24, donde se observa la presencia de 17 alelos, diferentes.

Fig.31 Patrón de bandas del microsatélites SO24 en el gemoplasma de *Solanum*. Las amplificaciones y electroforesis se efectuaron como se indica en Materiales y Métodos. El gel resultante se reveló con Nitrato de plata. A: chc; B: cmm; C: ktz; D: tar; E: spg; F: mga; G: mcd; H: vnt; I: vrn; J: ifd; K: gon; L: verr; M: phu; N: grf; O: opl; P: acl; Q: adg; R: Huinkul y S: tomate.



4.3.1. Construcción de la Matriz Básica de Datos

Los datos se codificaron como bandas presentes (1) o ausentes (0) y perdidos (5) en una matriz básica de datos donde cada alelo fue considerado como una variable (Fig. 32). Del mismo modo que con las técnicas anteriores, se ingresaron los datos al programa NTSys para construir las matrices de similitud y los dendrogramas (ver Materiales y Métodos).

El grado de polimorfismo encontrado por locus (combinación de oligonucleótidos) resultó ser relativamente alto. El número de alelos por cada combinación de oligonucleótidos fue entre 4 a 34 (sin considerar la existencia de multiloci) y considerando a todos los genotipos. (ver más adelante Tabla 30).

Fig. 32: MBD de Microsatélites de todos los genotipos. Se especifica, en la primera fila los nombres de los *loci*. En la segunda, el número de variable (banda) según su tamaño. En la primera columna se detallan las OTUs. Los códigos, (1) corresponden a presencia de la banda, (0) ausencia de la banda, (5) dato perdido.

Microsatélite	15	9	24	26
OTUVariable	12345678911111111111222222222233333 0123456789012345678901234	3333344444444444445555555555666666666 5678901234567890123456789012345678	677777777777888888 90123456789012345	8888 6789
Chc6116c	55555555555555555555555555555555	05000000000000000000000000000001	0000010000000000	1000
Chc4957	55555555555555555555555555555555	05000000000000000000000000000001	00000100000010000	1000
Chc49572	000000000000100000000000100000000	05000000000000000000000000000001	00000100000010000	1000
Chc49573	0000000000000100000000000100000000	00000000000000000000000000000001	00000100000010000	1000
Chc4957c	0000000000000100000000000100000000	00000000000000000000000000000001	00000100000010000	1000
chc5611m	55555555555555555555555555555555	05000000000000000000000000000001	00000001001000000	1000
Chc2955c	55555555555555555555555555555555	00000000000000000000000000000001	00000101000000000	1000
Chc29552	55555555555555555555555555555555	00000000000000000000000000000001	00000101000000000	1000
chc5341m	55555555555555555555555555555555	00000000000000000000000000000001	00001010000010000	1000
Chc7546	55555555555555555555555555555555	00000000000000000000000000000001	00000000000000000	5000
Chc75463	00000000000000000000000001010000000	00000000000000000000000000000001	00000001000000000	5000
Chc73091	0000000000000000000000000100001000000	00000000000000000000000000000001	10100001000000000	5000
Chc48101	55555555555555555555555555555555	00000000000000000000000000000001	5555555555555555555	0001
Chc48102	000000000000000000000000000000000	00000000000000000000000000000001	00001001000000000	1000
Cmm7310	000000000000000000000000000000000	100000000000000000000000000000010	00000000000001000	1000
Cmm7313	000000000000000000000000000000000	100000000000000000000000000000010	00000000000001000	1000
Cmm7254	000000000000000000000000000000000	100000000000000000000000000000010	5555555555555555555	1000
Cmm7270	000000000000000000000000000000000	100000000000000000000000000000010	00000000000001000	1000
Cmm7292	000000000000000000000000000000000	101000000000000000000000000000010	00000000000001000	1000
Ktz4937	000000010000000000000000000000000	001000000000000000000000000000000	00000001000010000	5000
Ktz4946	100000000000010000000000000000000	001000000000000000000000000000000	00000000000100000	1100
Ktz4964	000000000000000000000000000000000	00555555555555555555555555555555555	00000000000100000	1100
Ktz4971	55555555555555555555555555555555555	55555555555555555555555555555555555	00000000000100000	5000
Ktz4986	000000000100000000000000000000000	00555555555555555555555555555555555	00000000000100000	1000
Tar5889	00000000000000000000000001000000000	000000000100000000000000000000000	00000000000010000	1000
Tar5882	00000000000000000000000001000000000	001000000100000000000000000000000	00000000000010000	1000
Tar5891	00000000000000000005000000501010000	001000000100000000000000000000000	000000010000010000	1000
Tar5633	000000000000000001000000100000000	000000000100000000000000000000000	5555555555555555555	1000
Spg6108	000000000100000010000000000000000	000100000001000000000000000000000	000000000100010000	1000
Spg6147	000001001000000000000000000000000	000100000001000000000000000000000	000000000100010000	1000
Spg4201	010000010000000000000000000000000	000100000001000000000000000000000	000000000100010000	1000
Mga3787	000000000000000000000000000000000	000000000000000000000000000000000	00000000000001000	1000
Mga7504	00000000000000000000000001000000000	001010000000001000000000000000000	000000000000001000	1000
Mcd6881	000010000000000000000000000000000	000011000000001000000000000000000	00000000001010000	1000
Mcd7530	000000000000000000000000011000000	000100000000100000000000000000000	00000000000010010	1000
Mcd7493	000000000000000000000000000000000	000001000000100000000000000000000	00000000001010000	1000
Mcd4398	000000000000000000000000010000000	000101000000000100000000000000000	00000000000010010	1000
Mcd7634	000000000000000000000000010010000	000101000000000100000000000000000	00000000001010000	1000
Vnt7609	000000000000000000000000000000000	011110000000000000000000000000000	00000000000100000	1000
Vnt7618	000000000000000000000000000000000	011010000000000000000000000000000	00000000000100000	1000

4.3.2. Variabilidad de los microsatélites

En la tabla 26 se detallan las (alelos) generados por cada microsatélite en todos los genotipos evaluados. Puede verse que en algunos casos, el número de alelos superó al máximo esperado para el caso extremo de heterocigosis, sugiriendo la existencia de microsatélites multiloci. A continuación se describen observaciones particulares de cada microsatélite en las respectivas entradas.

El porcentaje de homocigosis de todos los individuos respecto de los 7 *loci* evaluados, fue de 45,4%. Para los citotipos diploides fue de 47,9%; 40 para los tetraploides y 47,6 para los hexaploides. Dicho porcentaje se evaluó considerando que la existencia de una banda única, se debe al estado de homocigosis de dicho locus, si bien se sabe que podrían existir alelos nulos. Sin embargo, esta posible fuente de error es mínima ya que los alelos nulos para microsatélites se toman en cuenta únicamente en determinadas situaciones, dado que no necesariamente reflejan la ausencia del *locus* (las SSR o repeticiones en tándem) sino a que las secuencias adyacentes que se aparean al oligonucleótido pierden su complementaridad por mutaciones puntuales (cuyo mecanismo de aparición es distinto al de los alelos SSR). Otra fuente de error, específica para los poliploides, es la subestimación de la homocigosis debido a la presencia de los homeoalelos. Como se mencionó anteriormente para el cálculo de homocigosis con datos de RFLP, no se cuenta con ensayos de progenies para verificar dichos estados.

- **Microsatélite SO24:**

La mayoría de las entradas de *S. chacoense* resultaron heterocigotas para este locus, igual que *S. spegazzinii* y *S. microdontum* dentro de las diploides, y dentro de las poliploides, se detectaron 2 alelos u homeoalelos en algunas entradas de *S. gourlayi* y *S. tuberosum ssp. andigena* y *S. oplocense* y un único alelo en todas las entradas de *S. acaule*.

- **Microsatélite SO06:**

En la mayoría de los casos se detectó un alelo por entrada. Excepcionalmente se detectaron 2, como por ejemplo algunas entradas de *S.*

commersonii, *S. spegazzinii* y *S. tuberosum ssp andigena*. En cambio se detectaron alelos nulos en todas las entradas de *S. microdontum*.

- **Microsatélite SO09:**

La mayoría de las entradas diploides resultaron heterocigotas, aunque no puede descartarse que sea un multiloci (dos) ya que varias veces se observaron 3 alelos en las diploides y hasta 5 o 6 en las poliploides. También se detectó la presencia de alelos nulos en todas las entradas de *S. chacoense* y en casi todas las de *S. commersonii*.

- **Microsatélite SO10:**

Dado el elevado número de bandas por cada entrada, se estima que posiblemente se amplifiquen al menos 3 loci diferentes. Por ejemplo, *S. chacoense* 6116 (Tabla 26, fila 1,col SO10), presentó 5 bandas, al igual que *S. kurtzianum* 4964, *S. spegazzinii* 6108, *S. microdontum* 4398, *S. ventunii* 7585 (tabla 26, fila 26, 33, 42 y 47, col SO10, respectivamente) y con 6 bandas *S. spegazzinii* 6147, 4201 y *S. vermei* 7617 (Tabla 26, fila 34, 35 y 49,col SO10, respectivamente); entre las especies diploides. Entre las poliploides, hubo hasta 7 bandas en *S. gourlayi* 3804 (Tabla 26, fila 56,col SO10) y en el resto distintos valores, hasta 1 banda por entrada como en *S. acaule* 7648 (Tabla 26, fila 64,col SO10) y *S. oplocense* 3964 (Tabla 26, fila 59,col SO10).

- **Microsatélite SO11:**

Se encontró en estado de homocigosis en casi todas las entradas diploides, con algunas excepciones en *S. chacoense*, *S. kurtzianum*, *S. spegazzini* y todas las entradas de *S. microdontum*. En casos aislados se detectaron 3 bandas entre los diploides. En cambio, se detectaron homeoalelos en varios de los genotipos tetraploides.

- **Microsatélite SO15:**

Esta combinación de primers no produjo buenas amplificaciones en muchos de los genotipos diploides, (posiblemente debido a cambios en la secuencias nucleotídicas adyacentes a los microsatélites haciendo que no sean completamente complementarias a los oligonucleótidos usados en la detección),

pero sí en los tetraploides, detectándose en muchos de los casos 4 y 5 bandas, indicando alto grado de heterocisgosis de los homeoalelos y entre sí.

- **Microsatélite SO16:**

Se evidenció como homocigota en casi todos los genotipos diploides, y en algunos genotipos tetraploides. En algunos casos se detectaron 2 bandas, que seguramente son homeoalelos.

4.3.3. Índice de contenido polimórfico por combinación de oligonucleótidos.

Recordando que el grado de polimorfismo que es capaz de detectar un marcador molecular determinado, está dado por la fórmula que se describe en Materiales y Métodos para cada locus.

$$PIC=1-\sum pi^2 ,$$

donde pi es la frecuencia de cada alelo en todos los genotipos.

Se calcularon dichos índices para cada microsatélite y sus valores se detallan a continuación en la **tabla 27**. Esos valores se computaron suponiendo un locus por combinación de oligonucleótidos, por lo tanto, hay valores que sobreestiman el cálculo. Los índices variaron de 0,0495 (SO26) a 0,90 (SO15) dentro de los genotipos diploides; y de 0,0495 (SO26) a 0,795 (SO15), para los poliploides.

Tabla 26. Detalle del número de alelos de cada OTU con los distintos microsatélites. Se resaltan en negrita los que revelan a más de un locus. *multilocus. En la primera fila se describe el número de *loci* estimado, en la segunda, los nombres de los microsatélites. En cada columna se indica el número de bandas observadas, con **p** se indica el dato perdido, y **nulo** indica la ausencia de banda. En la penúltima columna se indica el número putativo de alelos homocigotas de cada locus y en la última se registran los porcentajes estimativos de homocisgosis de cada entrada calculados relativos al número de *loci* que resultaron con amplificación. Se consideró que cuando hubo una única banda presente (1 en la tabla) se trata de un locus homocigota.

	Nro loci estim	Diploides							hom	%hom
		1	1	2	3	2?	3	1		
	Microsatélite	24	6	9	10*	11	15	26		
1	chc6116	1	1	nulo	5	1	p	1	4	80
2	chc49571	2	1	nulo	4	1	p	1	3	60
3	chc49572	2	1	nulo	3	1	2	1	3	50
4	chc49573	2	1	nulo	3	p	2	1	2	40
6	chc4957c	2	1	nulo	4	1	2	1	3	50
7	chc5611m	2	1	nulo	p	p	p	1	2	33
8	chc2955c	2	1	nulo	3	1	p	1	3	60
9	chc29552	2	1	nulo	4	1	p	1	3	60

	Microsatélite	24	6	9	10*	11	15	26	hom	%hom
11	chc5341m	3	1	nulo	4	1	p	1	3	60
12	chc7546	p	1	nulo	4	2	p	p	1	25
13	chc75463	1	1	nulo	4	2	2	p	2	40
14	chc73091	3	1	nulo	4	3	2	p	1	20
16	chc48108	p	1	nulo	1	1	p	1	3	75
17	chc4810	2	1	nulo	3	1	p	1	2	40
18	cmmc1	2	2	nulo	p	1	p	1	2	40
19	cmm7310	1	2	nulo	2	1	p	1	3	60
20	cmm7313	1	1	nulo	2	1	p	1	4	80
21	cmm7254	p	2	nulo	1	1	p	1	3	75
22	cmm7270	1	1	nulo	2	1	p	1	4	67
23	cmm7292	1	1	1	2	1	p	1	5	71
24	ktz4937	2	1	1	2	1	1	1	5	71
25	ktz4946	1	1	1	3	2	1	2	4	57
26	ktz4964	1	1	p	5	1	p	2	3	60
27	ktz4971	1	1	p	4	1	p	1	4	80
28	ktz4986	1	1	p	4	1	1	1	5	83
29	tar5889	1	1	1	p	p	1	1	5	100
30	tar5882	1	1	2	1	p	1	1	5	83
31	tar5891	1	1	2	2	1	2	1	4	57
32	tar5633	p	1	1	4	1	3	1	4	67
33	spg6108	2	2	2	5	2	1	1	2	29
34	spg6147	2	3	2	6	1	2	1	2	29
35	spg4201	2	2	2	6	1		1	2	29
36	mga3787	1	1	1	3	1	1	1	6	86
37	mga7504	p	1	1	3	1	p	1	4	80
38	mga4430	1	p	3	3	1	1	1	4	67
39	mcd6881	2	nulo	3	3	2	1	1	2	33
40	mcd7530	2	nulo	2	3	2	2	1	1	17
41	mcd7493	2	nulo	1	3	2	1	1	3	50
42	mcd4398	2	nulo	3	5	p	1	1	2	40
43	mcd7634	2	nulo	3	4	2	2	1	1	17
44	vnt7609	1	1	3	4	p	p	1	3	60
45	vnt7618b	1	1	2	4	2	p	1	3	50
46	vnt7619a	1	1	2	4	1	p	1	4	67
47	vnt7585	1	1	2	5	3	p	p	2	40
48	vrn7614	1	p	1	2	1	1	p	4	80
49	vrn7617	1	1	3	6	1	2	p	3	50
51	ifd	1	1	2	3	1	p	p	3	60
75	gonio	1	1	3	5	3	1	1	4	57
76	verru	1	1	2	1	p	1	p	4	80
77	phur	p	1	1	3	1	p	p	3	75
52	gri4837	1	1	3	4	3	2	p	2	33

Tetraploides

	Microsatélite	24	6	9	10*	11	15	26	hom	%hom
53	gri4841.2	1	p	1	6	2	2	p	2	40
54	gri5421	2	p	2	5	2	3	p	0	0
55	gri7680	1	p	2	5	1	p	1	3	60
56	gri3804	2	p	2	7	3	4	p	0	0
57	gri5503	1	p	2	3	1	5	1	3	50
61	aci4377	1	1	3	3	2	2	1	2	23
62	aci5756	1	1	3	3	3	2	1	2	23
63	aci4005	1	1	1	2	2	2	1	4	57
64	aci7648	1	1	1	1	1	3	2	5	71
65	adg799	p	1	5	p	3	2	1	2	40
66	adg668	1	1	4	4	2	4	2	2	23
67	adg557	2	1	4	5	3	3	1	2	23
68	adg493	2	2	4	5	3	3	1	1	14
69	adg662	2	1	4	5	2	2	1	2	19
70	adg483	1	1	4	5	2	4	1	3	43
71	adg796	2	3	6	6	3	5	1	1	14
72	adg7507	2	1	3	6	4	5	1	2	19
73	Huinkul	1	2	4	5	2	p	2	1	17
74	tomate	1	p	1	p	p	1	p	3	100

Hexaploides

	Microsatélite	24	6	9	10*	11	15	26	hom	%hom
58	opl5476	2	1	2	p	1	2	p	2	29
59	opl3964	1	1	1	1	2	2	1	5	71
60	opl5478	2	1	2	2	1	2	1	2	29

Tabla 27: Índices de polimorfismos detectados en los genotipos de *Solanum*. En la primera columna se indica el nombre del microsatélite. En la segunda y tercera, se indican los índices en cada grupo de ploidía.

Denominación	Diploides	Poliploides
SO15	0.90	0.795
SO09	0.736	0.2075
SO24	0.679	0.468
SO26	0.0495	0.04069
SO11	0.898	0.454
SO06	0.891	0.675
SO10	0.885	0.408

De estos resultados puede observarse que los microsatélites más apropiados para la discriminación de estos taxones son: SO15, SO06 y SO10, que son los que muestran un mayor índice en ambos grupos de citotipos. En cambio el SO26 no tiene utilidad más que para diferenciación por los bajísimos valores que se observan.

4.4.Comparación de la eficiencia relativa de los distintos marcadores moleculares empleados para detectar variabilidad genética en papa

Para evaluar la capacidad relativa que tienen los distintos marcadores moleculares en el estudio de la variabilidad genética se necesita, al menos, que se cumplan estos dos aspectos: capacidad para detectar la variabilidad genética (índices de contenido polimórfico) y capacidad de los diferentes ensayos para determinar la relación genética entre los genotipos.

Para el caso de RFLP y AFLP cada banda fue considerada como perteneciente a un *locus* simple e independiente, mientras que para SSR (marcadores de visualización co-dominante) cada combinación de "primers" fue considerada como un *locus* simple (e independiente). Con el fin de evitar alteraciones de los índices de polimorfismo por la inclusión del grupo de control externo tomate (en diploides y poliploides) y del cultivar Huinkul MAG (entre los genotipos diploides), los mismos fueron excluidos del cálculo antes mencionado.

Considerando el resultado de la utilización de 15 sondas seleccionadas de RFLP, se produjo un total de 93 y 60 productos de digestión claramente visibles para los citotipos diploides y tetraploides respectivamente, con un promedio de 6 y 4 bandas por ensayo para cada grupo de ploidía. Del total de bandas generadas, sólo 6 fueron monomórficas (aproximadamente el 93% y 90% evidenciaron polimorfismos para sendos grupos respectivamente).

Utilizando 4 combinaciones de "primers" con la técnica de AFLP, se obtuvieron 244 y 144 productos totales diferentes para citotipos diploides y poliploides respectivamente, con un promedio de 61 y 36 bandas por combinación de "primers" para cada grupo de ploidía, de las cuales el 97% y 89% evidenciaron polimorfismos.

Los 7 SSR analizados, mostraron 132 y 83 productos diferentes para citotipos diploides y poliploides respectivamente, con un promedio de 18,8 y 11,8 bandas por ensayo para cada grupo, de las cuales el 99% evidenciaron polimorfismos en ambos grupos.

El hecho que el número de bandas generadas mediante las tres herramientas haya sido inferior en los genotipos poliploides respecto al de los diploides, fue debido a que la entre los genotipos diploides, existieron muchas bandas raras y únicas, que al momento del cómputo de bandas totales, fueron consideradas incrementando dicho valor. Por este motivo, cuando se computaron el total de bandas por genotipo, (no en grupos) este fenómeno no fue observado. En la **tabla 28** se resumen los resultados obtenidos con las distintas herramientas moleculares empleadas.

Tabla 28: Características de los ensayos realizados A: Especies diploides B: Especies poliploides. En la primera columna se indica la técnica utilizada. En la segunda, el número de ensayos realizados con cada herramienta; (en el caso de RFLP y SSR, estos valores se aproximan al número de *loci* evaluados). En la tercera, el número de marcadores totales generados (número de alelos (o *loci*) detectados en todo el grupo), en la cuarta, el número de marcadores que resultaron polimórficos, en la quinta, la efectividad de cada técnica representada por el número de bandas por ensayo y en la sexta, el porcentaje de marcadores polimórficos.

A: diploides

	# ENSAYOS	# BANDAS TOTALES	# BANDAS POLIMORFICAS	BANDAS POR ENSAYO	%POLIM
RFLP	15	93	87	6,2	93
AFLP	4	244	236	61	97
SSR	7	132	131	18.8	99

B: poliploides

	# ENSAYOS	# BANDAS TOTALES	# BANDAS POLIMORFICAS	BANDAS POR ENSAYO	%POLIM
RFLP	15	61	55	4,1	90
AFLP	4	144	129	36	89
SSR	7	83	82	11.8	99

El porcentaje de polimorfismo fue elevado en todos los casos y la técnica más efectiva en cuanto a generación de datos fue la de AFLP (mayor número de bandas por ensayo).

4.5. Estimación de la distancia genética entre la papa cultivada y su germoplasma relacionado basado en las bandas compartidas

Se observó que 2/3 del total de bandas (AFLP y RFLP) eran comunes entre diploides y tetraploides, mientras que sólo 1/3 de las bandas de microsatélites lo eran. Esto era previsible considerando la elevada tasa de evolución de estos tipos de marcadores (SSR) (ver Tabla 29). No obstante la disimilitud de tamaño de los fragmentos amplificados, fue posible la amplificación de prácticamente todos los microsatélites en todas las especies analizadas. Esto indica la alta conservación de las zonas flanqueantes donde hibridizan los primers, con algunas excepciones. El microsatélite SO06, evidenció la existencia de alelos nulos en todas las entradas de las especies de *S. microdontum*, *S. chacoense* y el SO09 en *S.*

commersonii (aunque estas no poseen los menores índices de similitud con *S. tuberosum ssp. tuberosum* (Huinkul en este caso) (Milbourne *et al.*, 1997).

La variedad de tomate utilizada casi no produjo amplificaciones con ningún grupo de primers utilizados a las temperaturas ensayadas, lo que probablemente sea debido a que la distancia intergenérica ya es demasiado grande como para mantener conservadas las secuencias flanqueantes al microsatélite.

En la tabla 29 se detallan los marcadores comunes y distintos entre los citotipos del germoplasma evaluado. Se compararon los citotipos diploides *versus* los poliploides y, los citotipos diploides y poliploides vs el cultivar de papa estudiado como referencia. En la tabla 30 se indican en particular los *loci* de RFLP y SSR.

Como puede observarse en estos datos, (tabla 29b), el análisis del conjunto (2x vs poliploides), indica que el número de bandas compartidas supera al de las no compartidas entre los distintos taxones, salvo para los microsatélites. Esto indica un relacionamiento genético (parentesco) importante entre las distintas especies del género. El número de bandas RFLP y AFLP compartidas entre los citotipos diploides y poliploides fue casi del doble respecto de las diferenciales. En cambio, en número de bandas compartidas de SSR respecto de las diferenciales, constituyeron sólo la mitad. (tabla 29a, col 1). Es decir, el germoplasma diploide y el poliploide comparten, proporcionalmente, más bandas de AFLP y RFLP que bandas SSR (que son las de evolución más rápida). El caso de los microsatélites es distinto porque es conocido que la conservación del número de repeticiones de estas secuencias hipervariables no es usual entre especies distintas, aún en casos de que estén relacionadas. A pesar de esto, existe un número de bandas compartidas importante que reafirma el concepto anterior. Cuando se compara con la referencia de papa cultivada exclusivamente, la proporción se invierte y el número de bandas diferenciales supera a las compartidas dando una idea de toda la variabilidad no presente en la especie cultivada potencialmente aprovechable para el mejoramiento. En cambio, prácticamente no existen diferencias en el número de bandas compartidas entre papa y las especies diploides o poliploides, es decir **el número de bandas que papa comparte con su germoplasma**

relacionado es el mismo independientemente de la ploidía del grupo y confirma la estrecha relación evolutiva entre especies de distinta ploidía y en particular, con la papa cultivada.

Tabla 29: Bandas electroforéticas compartidas y diferenciales en el germoplasma de *Solanum* sp.

a) Comparación de los números absolutos de bandas compartidas y diferenciales

	2x vs poliploides		2x vs Papa		Poliploides vs Papa	
	+/+	+/- 0 -/+	+/+	+/- 0 -/+	+/+	+/- 0 -/+
RFLP	57	35	18	59	14	35
AFLP	169	81	134	116	132	51
SSR	58	101	14	98	18	46

Se indican como +/+, a las bandas presentes en los dos grupos de genotipos; y +/- ó -/+, a las bandas presentes en sólo uno de los dos conjuntos de individuos. Se compararon los citotipos diploides versus los poliploides (Columna 2), los citotipos diploides versus el cultivar de papa (Columna 3) y los citotipos poliploides vs el cultivar de papa estudiado (Columna 4).

b) Relación entre bandas no compartidas y compartidas.

	2x vs poliploides	2x vs Papa	Poliploides vs Papa
RFLP	0,61	3,2	2,5
AFLP	0,47	0,9	0,4
SSR	1,75	7,14	2,56

La tabla (b) se relativizó, calculando el cociente entre bandas diferenciales y bandas compartidas. En negrita se señalan los casos en que las bandas diferenciales superaron a las compartidas.

c) Proporción de bandas diferenciales entre los distintos genotipos

	2x vs poliploides	2x vs Papa	Poliploides vs Papa
RFLP	0,38	0,63	0,40
AFLP	0,32	0,46	0,28
SSR	0,63	0,88	0,72

En este caso los datos fueron relativizados al número de bandas totales, es decir se calcularon las relaciones entre las bandas no compartidas y las bandas totales.

4.6. Distribución de alelos en los loci sinténicos de RFLP y SSR.

Con el objeto de conocer la distribución particular de los alelos en los *loci* sinténicos dentro del germoplasma, se evaluaron el número de ellos presentes en cada grupo de ploidía y para cada sonda de RFLP y microsatélite individualmente (dado que el número de cromosomas por grupo fue comparable entre grupos, y se detalla en la primera fila de la **Tabla 30**).

El porcentaje de alelos compartidos entre el germoplasma diploide y tetraploide, osciló desde 33% hasta 100%, para RFLP y de 5,8% hasta 46%, para

los microsatélites, (**Tabla 30 A y B**) reflejando estos valores la elevada similitud genética entre los dos grupos de citotipos, como se indicó anteriormente (**Tabla 29**).

Las sondas TG441 (5) y TG482(6) mostraron menor porcentaje de alelos (bandas) compartidos entre los diploides y poliploides y la sonda TG183 (7) y Tg408 (10), no generaron alelos diferenciales entre ambos grupos de ploidías.

El microsatélite SO24, mostró un único alelo común entre diploides y poliploides (5,8%) y el microsatélite SO10, mostró 14 alelos comunes (46%); y los demás mostraron valores intermedios (**Tabla 30**).

Para los microsatélites SO10, SO06 y SO26 la mayoría de los alelos provinieron de las OTUs diploides indicando su alta variabilidad en estos citotipos.

El hecho que exista un porcentaje importante de alelos comunes en ambos grupos de ploidías, podría indicar la existencia de fragmentos genómicos provenientes de las diploides, presentes en las especies poliploides, y dada la elevada tasa de mutación de estos segmentos, indicarían, como ya se indicó, una reciente historia evolutiva; aunque no puede descartarse que algunos surjeran por convergencia evolutiva.

Tabla 30. Número de total de variantes alélicas por *locus*. En la primera fila se indica el número de cromosomas evaluados en todos los genotipos analizados. En la primera columna se indica el locus genético, (A: sonda genómica y número de cromosoma entre paréntesis y B: microsatélite) en la segunda, el número de alelos en el conjunto de las especies diploides; en la tercera, el número de alelos en el conjunto de las especies poliploides, en la cuarta, el número de alelos comunes y su porcentaje respecto del total de alelos por locus entre paréntesis y en la quinta, el número total de alelos por locus en todo el germoplasma.

A # de cromosomas Sonda #	1152		1008		Totales
	Diploides	Poliploides	Comunes	# de alelos por <i>locus</i>	
TG479(3)	8	6	6 (75%)	8	
TG408(10)	3	3	3 (100%)	3	
TG444(6)	4	5	4 (80%)	5	
TG441(5)	4	4	2 (33%)	6	
TG510(8)	4	3	4 (57%)	7	
TG574(4)	5	3	3 (43%)	7	
TG 480(2)	7	5	3 (33%)	9	
TG245(1)	9	6	6 (67%)	9	
TG473(12)	7	3	3 (43%)	7	
TG482(6)	4	3	4 (80%)	5	
TG393(11)	9	6	6 (67%)	9	
TG183(7)	4	4	4 (100%)	4	
TG419 (5)	5	3	3 (60%)	5	
TG404(9)	8	6	6 (75%)	8	
totales	81	60	57 (62%)	92	

B # de cromosomas Microsatélite #	1152	1008		Totales
	Diploides	Poliploides	# de alelos por locus Comunes	
SO24	12	6	1 (5,8%)	17
SO06	14	6	5 (33%)	15
SO09	23	18	10 (32%)	31
SO10	30	14	14 (46%)	30
SO11	27	20	13 (38%)	34
SO26	3	2	1 (25%)	4
SO15	18	22	9 (29%)	31
totales	127	88	53 (35%)	162

4.7. Potencial genético de las especies silvestres:

Como uno de los objetivos de esta tesis es estimar la variabilidad genética potencialmente utilizable para aumentar la base genética de la papa cultivada en programas de mejoramiento y también dirimir criterios para elegir cuáles entradas (o "accesiones") resultaría necesario conservar en bancos de germoplasma para preservar dicha variabilidad, se prestó particular atención a la evaluación de las bandas novedosas respecto de papa en el germoplasma estudiado. Para ello se compararon los datos de Huinkul MAG (Tabla 31) con el resto del germoplasma agrupando los genotipos silvestres de diferente manera:

- a) global (todos los genotipos conjuntamente);
 - b) en forma individual (por entrada) y
 - c) agrupados por especies, como taxones simulados (cada una involucrando a los alelos presentes en todas las entradas de una misma especie).
- a) Se construyó un "taxón simulado" que agrupó a todos los alelos presentes en **todas las entradas** estudiadas y se comparó con los alelos presentes en Huinkul MAG. El total de alelos novedosos presente en todo el conjunto de genotipos (utilizando las tres metodologías) reveló la existencia de 111 bandas nuevas de AFLP, 65 de RFLP y 142 de SSR. Estas cifras absolutas pueden estar sujetas a sobreestimaciones por el hecho de que sólo se está utilizando como referencia para la especie "papa cultivada" (*Solanum tuberosum ssp tuberosum*) un solo genotipo de referencia (sin incluir, por lo tanto, aquellos alelos presentes en la misma especie pero ausentes en este cultivar) También es cierto que la muestra de germoplasma puede no ser

del todo representativa de los alelos presentes en ella y puede conducir a una subestimación del potencial de variabilidad. Por otro lado, otro factor importante a ser tenido en cuenta es que en el mejoramiento de papa ya se han utilizado cruzamientos interespecíficos y que algunos de los alelos que *Huinkul MAG* comparte con otras especies pueden ser consecuencia de introgresiones a partir de estos cruzamientos amplios (esto no es un problema exclusivo de *Huinkul MAG*, lo mismo pasaría con cualquier otro cultivar de papa que pasó por una etapa de mejoramiento genético). Estos hechos nos debe hacer cautelosos en las conclusiones del origen de las homología encontradas dado que algunas de las mismas no serían debidas a un parentesco cercano sino a transferencias horizontales de segmentos cromosómicos a través de los cruzamientos amplios, aunque también es cierto que la facilidad de estos cruzamientos está directamente relacionada a la cercanía evolutiva entre las especies que se cruzan. Lo que también es cierto y los hace interesantes para estas comparaciones, es que los marcadores moleculares (al ser fenotípicamente y selectivamente "neutros") representan mucho mejor la evolución "natural" que los caracteres fenotípicos "clásicos" que suelen ser objeto de selección artificial (y natural). Es decir, que los marcadores moleculares aportan información menos sujeta a los condicionantes explicados ofreciendo menor sesgo que los caracteres morfológicos, particularmente aquellos de interés agronómico.

- b) Se evaluaron los alelos novedosos de cada entrada, respecto del cultivar de referencia (ver Tabla 31). Las entradas que presentaron mayores valores relativos de alelos novedosos fueron: *S. acaule* 4377, *tomate*, *S. kurtzianum* 4971, 4937, *S. commersonii* 7310, 7270, 7313, *S. chacoense* 5341m, *S. kurtzianum* 4964, *S. commersonii* 7254 y *S. tarijense* 5891, en orden decreciente; y las entradas que mostraron menos alelos novedosos hasta llegar a *Huinkul MAG* fueron; *S. goniocalyx*, *S. phureja*, *S. oplocense* 5478, *S. tuberosum* ssp *andigena* 493, 557, 7507, 796, 799, 668, 662, 483 y *Huinkul MAG*. Estos datos tienen coherencia con la cercanía evolutiva con la papa dado que las últimas pertenecen a otra subespecie de *Solanum tuberosum* y por lo tanto al taxón más emparentado con el genotipo de referencia. *S. goniocalyx*, *S. phureja* y *S. oplocense* también son especies cultivadas e interfértiles con la papa comercial. Por lo tanto, tomando en cuenta los fac-

tores condicionantes enunciados en el ítem anterior, se puede afirmar que, con marcadores moleculares, si bien se demuestra que a mayor cercanía, se corresponde un menor número de alelos novedosos, no podemos extrapolar conclusiones sobre el origen de esa cercanía evolutiva, la cual bien puede tener componentes artificiales además de los naturales.

Tabla 31: Nro total de alelos novedosos respecto del cv. Huinkul MAG, evaluados con las tres metodologías.

En la primera fila se detallan las OTUs, en la segunda, tercera y cuarta, el número de alelos auesentes en el cv. Huinkul Mag, el número de alelos totales y datos perdidos correspondiente a los datos obtenidos mediante RFLP. Las tres filas siguientes corresponden a los mismos datos calculados para AFLP y las tres siguientes para SSR. En la fila "totales", se indican los valores de las bandas obtenidas mediante RFLP. En la siguiente "novedosos" indican el total de bandas novedosas obtenidas con las tres herramientas. "Perdidos" indica el total de datos perdidos con las tres técnicas; "% perdidos": datos perdidos respecto del total de bandas evaluadas; "nov/ totales": indica el cociente del total de bandas novedosas respecto del total de bandas evaluadas para cada entrada. "Nov/ (tot-nov)": se relativizaron las bandas os novedosas según el total de bandas restadas las novedosas. "comunes": indica bandas comunes con el cultivar Huinkul Mag (bandas presentes en las entradas y compartidas por Huinkul MAG). Los taxones se ordenaron según la fila 17 (al nov/totales).

taxón	Huinkul	adg483	adg662	adg668	adg799	adg796	adg7507	adg557	adg493	opi5478	phur	gonio	gr14837	gr15421	opi3964	ifa	mcd6881	opi5476	chc7546	chc4810	chc49573	gr13804	vnt7609	vnt7618b	spg6108	spg6147	aci7648	aci4005	chc5611m	chc49572	vnt7617	tar5889	
rflp																																	
alelos tot	15	28	27	29	29	28	23	33	31	24	29	19	20	18	20	19	21	31	11	19	23	24	19	23	29	23	29	24	15	27	7	22	
novedosos	0	8	9	9	10	10	6	12	12	7	13	9	6	4	6	9	6	12	2	6	7	10	4	5	11	7	12	9	4	10	6	7	
perdidos	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0	3	1	12	0	3	56	1	3	1	1	0	0	0	0	0	49	0	50	1	
aflp																																	
alelos tot	103	88	56	50	73	93	98	45	32	23	96	89	71	60	37	68	85	31	79	83	100	31	77	80	85	86	71	68	84	100	84	86	
novedosos	0	10	2	3	9	12	15	4	0	3	21	21	18	17	9	17	27	8	28	28	37	6	28	29	27	31	24	24	33	37	26	33	
perdidos	37	14	23	26	16	12	10	30	85	87	4	3	0	8	35	28	0	83	2	1	0	44	0	0	0	0	17	16	0	0	0	1	
ssr																																	
alelos tot	18	15	15	13	11	22	18	15	17	9	4	12	13	13	10	7	11	6	6	8	9	16	10	11	16	15	9	9	4	10	9	7	
novedosos	0	1	6	4	3	8	9	6	7	6	3	7	9	8	7	6	7	4	4	5	4	10	7	8	10	8	5	5	2	5	6	4	
perdidos	38	0	0	0	48	0	0	0	0	1	18	0	1	16	1	39	0	2	36	0	0	2	34	0	0	0	0	0	14	0	1	1	
totales	136	131	98	92	113	143	139	93	80	56	129	120	104	91	67	94	117	68	96	110	132	71	106	114	130	124	109	101	103	137	100	115	
nov(aflp,rflp,ssr)	0	19	17	16	22	30	30	22	19	16	37	37	33	29	22	32	40	24	34	39	48	26	39	42	48	46	41	38	39	52	38	44	
perdidos tot	95	14	23	26	64	12	10	30	85	88	22	8	1	27	37	79	0	88	94	2	3	47	35	0	0	0	17	16	63	0	51	3	
% perdidos	3	4	5	12	2	2	6	16	17	4	2	0	5	7	15	0	17	18	0	1	9	7	0	0	0	0	3	3	12	0	10	1	
nov/tot	0	14	17	17	19	21	21	23	23	28	28	30	31	31	32	34	34	35	35	35	36	36	36	36	36	37	37	37	37	38	38	38	
nov/(tot-nov)	0	17	21	21	24	26	27	31	31	40	40	44	46	46	48	51	51	54	54	54	57	57	58	58	58	59	60	60	60	61	61	62	
comunes (tot - nov)	136	112	81	76	91	113	109	71	61	40	92	83	71	62	45	62	77	44	62	71	84	45	67	72	82	78	68	63	64	85	62	71	

taxón	mcd7530	chc2955c	mcd7493	chc6116	vn7619a	spg4201	mcd7634	chc75463	mga7504	chc4957c	tar5882	vn7585	chc73091	chc49571	kz4946	mcd4398	chc48108	verru	aci5756	cmm7292	tar5633	kz4986	chc29552	tar5891	cmm7254	kz4964	chc5341m	cmm7313	cmm7270	cmm7310	kz4937	kz4971	tomate	
alelos tot	24	28	26	18	15	24	24	16	13	26	16	20	27	26	21	26	22	21	27	22	20	18	27	22	20	24	24	18	22	18	26	25	26	
novedosos	9	11	10	4	6	9	9	5	5	10	7	6	13	9	6	10	9	14	11	9	8	7	11	8	11	11	10	8	11	9	10	11	18	
perdidos	0	0	0	38	0	0	1	48	10	2	2	7	1	0	2	1	1	2	2	3	0	0	0	1	1	0	0	2	1	1	0	0	0	
afip																																		
alelos tot	85	82	52	88	77	85	81	66	70	102	78	89	80	100	92	87	12	76	79	64	85	91	57	94	103	96	55	99	96	95	62	103	69	
novedosos	29	29	16	36	28	32	28	26	26	40	28	34	28	41	39	34	5	26	30	27	37	40	25	41	46	42	25	46	45	45	30	48	41	
perdidos	0	0	66	0	0	0	1	1	2	0	0	0	0	0	0	0	176	4	15	19	0	0	22	0	0	0	92	1	0	1	68	0	37	
ssr																																		
alelos tot	13	9	12	9	10	13	14	9	8	10	8	11	10	8	11	11	2	6	13	9	8	6	8	13	7	8	9	8	9	9	9	8	3	
novedosos	9	6	9	5	6	7	10	5	5	5	6	9	7	5	6	7	1	3	10	5	4	3	5	9	2	6	6	5	5	5	7	7	1	
perdidos	0	34	0	35	0	0	0	1	0	0	2	1	1	36	0	34	31	1	0	0	17	32	34	2	17	32	34	0	0	0	1	69	4	
totales	122	119	90	115	102	122	119	91	91	138	102	120	117	134	124	124	36	103	119	95	113	115	92	129	130	128	88	125	127	122	97	136	98	
nov(afip,rflp,ssr)	47	46	35	45	40	48	47	36	36	55	41	49	48	55	51	51	15	43	51	41	49	50	41	58	59	59	41	59	61	59	47	66	60	
perdidos tot	0	34	66	73	0	0	2	50	12	2	4	8	2	36	2	35	208	7	17	22	17	32	56	3	18	32	126	3	1	2	70	69	41	
% perdidos	0	6	13	14	0	0	0	10	2	0	1	2	0	7	0	7	40	1	3	4	3	6	11	1	3	6	24	1	0	0	13	13	8	
nov/tot	39	39	39	39	39	39	39	40	40	40	40	41	41	41	41	41	42	42	43	43	43	43	45	45	45	45	46	47	48	48	48	49	61	
nov/(tot - nov)	63	63	64	64	65	65	65	65	65	66	67	69	70	70	70	70	71	72	75	76	77	77	80	82	83	86	87	89	92	94	94	94	15E	
comunes (tot - nov)	75	73	55	70	62	74	72	55	55	83	61	71	69	79	73	73	21	60	68	54	64	65	51	71	71	69	47	66	66	63	50	70	38	

La correlación entre el número de cromosomas evaluados y el número de bandas novedosas (a) resultó negativa al igual que la correlación con las bandas novedosas relativizadas respecto del total de cromosomas evaluados (b). Esto está indicando que en los citotipos poliploides, el número de alelos novedosos es menor que en los diploides. La correlación entre el número de bandas totales y el número de cromosomas evaluados fue también negativa, evidenciando una disminución de detección de alelos en los citotipos poliploides (correspondientes a los homeoloci), debido posiblemente a mayor homocigosis o . Por otro lado, la correlación entre número de datos perdidos y el número de bandas novedosas, si bien negativa, no fue muy importante, indicando que a pesar de la existencia de datos perdidos, éstos no mostraron influenciar de manera importante los resultados obtenidos. En la **tabla 32** se detallan los coeficientes de correlación entre los distintos datos.

Tabla 32: Coeficientes de correlación entre número de cromosomas y a) número de bandas novedosas, b) bandas novedosas relativizadas; c) número de bandas totales; d) bandas novedosas y datos perdidos, a partir de los distintos datos obtenidos de las evaluaciones de las entradas individuales.

a)	Nro de crom y nov	-0,69
b)	Nro de crom y nov relativizados	-0,44
c)	Crom y total	-0,48
d)	Nov y perdidos	-0,36

c) Se construyeron taxones simulados representando a cada una de las especies y se compararon entre sí.

Para relativizar los datos, debido al número distinto de genotipos utilizados en cada taxón simulado y al distinto nivel de ploidía, se analizaron los cocientes de los alelos novedosos respecto de los alelos totales por taxón, y también respecto de los alelos compartidos con Huinkul MAG, (totales sin incluir a los novedosos, ver tabla, 34). En realidad relativizar respecto del total de bandas o respecto del total de bandas compartidas no ocasionó discrepancias y el coeficiente de correlación entre ambos grupos de relativizados de ambas formas fue de 0,972.

Si bien estas diferencias posiblemente reflejan diferencias en la antigüedad evolutiva de cada una de las especies (acumulación relativa diferencial de

mutaciones en función del momento de especiación), estas interpretaciones deben tomarse (en este caso) con suma cautela y son sólo especulativas, dado el bajo número de individuos analizados por taxón (en casos extremos representados por una sola entrada) y el posible error de muestreo en las entradas analizadas que podrían no ser representativas de la variabilidad genética global del grupo taxonómico. No obstante, el grado de acercamiento genético concuerda con estos datos con la excepción de tomate, que muestra un valor intermedio de bandas novedosas respecto del cultivar. Este dato inesperado, podría indicar que la distancia genética respecto del control externo es tan grande que resulta errónea, particularmente por el hecho de utilizar los datos de microsatélites que prácticamente no tuvieron amplificaciones en tomate. El orden decreciente de especies con mayor número de alelos novedosos relativos fue: *S. chacoense*, *S. tarijense*, *S. kurtzianum*, *S. commersonii*, *S. microdontum*, *S. acaule*, *S. oplocense*, *S. gourlayi*, *S. venturii*, *S. spagazzinii*, *tomate*, *S. verrucosum*, *S. tuberosum ssp. andigena*, *S. infundibulliforme*, *S. megistacrolobun*, *S. vernei*, *S. goniocalyx* y *S. phureja*.

Los porcentajes de bandas novedosas respecto del total de bandas de cada taxón simulado (ver tabla 33) indican que los AFLP generaron desde 12% hasta 41 % de bandas novedosas, los RFLPs desde 40 a 78% y los microsatélites desde 50% hasta 92% de bandas novedosas, indicando que el grado de conservación de las secuencias evaluadas mediante cada herramienta disminuye de AFLP a RFLP a SSR.

Tabla 33: Porcentaje de alelos novedosos (ausentes en el cultivar Huinkul MAG) respecto del total de alelos presentes por taxón simulado (evaluados mediante las tres herramientas). Los taxones se ordenaron de manera decreciente según el porcentaje total de bandas novedosas.

	Huinkul	phur	gonio	vrn7617	mgasim	ifd	adgsim	verru	tomate	spgsim	vntsim	grlsim	oplsim	aclsim	mcdsim	ktzsim	cmmsim	tarsim	chcsimul
% nov aftp	0	12	17	23	28	28	10	30	29	29	32	22	21	26	31	38	35	37	41
%nov rftp	0	57	60	40	53	60	62	58	78	56	54	52	58	62	63	58	71	63	68
%nov ssr	0	75	58	80	60	86	76	66	50	80	82	90	83	90	89	88	77	87	92

Tabla 34: Número de alelos novedosos (ausentes en el cultivar Huinkul MAG y presentes en cada taxón simulado (evaluados mediante las tres herramientas). En la fila 1, se detalla el nombre de las especies simuladas; en la 2, el número de genomios diploides analizados por especie simulada; en la 3, el número de cromosomas evaluados; en la 4 el número de entradas por taxón simulado; en la 5, 6, 7-8,9,10-11,12,13 el número de bandas novedosas, totales y datos perdidos, según cada técnica (AFLP, RFLP y SSR respectivamente); en la 14, el número de bandas novedosas totales (todas las técnicas); en la 15 el número de bandas totales (todas las técnicas); en la 16 el total de los datos perdidos (todas las técnicas), en la fila 17, el porcentaje de bandas novedosas respecto de las totales, en la 18, el porcentaje de bandas novedosas por taxón simulado con las tres metodologías respecto de las bandas totales sin contar las novedosas; en la 19, la relación de los datos perdidos respecto del total de bandas y en la 20, el porcentaje de datos perdidos respecto del total de bandas (variables) evaluadas.

1	Taxón simulado	Huinkul	Pur	gonio	vm7617	mgasim	fid	adgsim	verl	tomate	spgsim	vtmsim	gfsim	oplsim	acsim	mcdsim	cmsim	ktzsim	tasim	chcsimul
2	Nro genomios/sp sim	2	1	1	1	2	1	16	1	1	3	5	5	9	6	4	5	5	4	14
3	# cromosomas	48	24	24	24	48	24	384	24	24	72	120	120	216	144	96	120	120	96	336
4	# entradas/taxón	1	1	1	1	2	1	8	1	1	3	5	3	3	3	4	5	5	4	14
5	afnov	0	10	14	17	21	18	10	21	19	25	28	17	8	18	32	35	41	37	53
6	aftot	103	85	82	75	74	64	99	70	66	87	87	76	38	70	103	99	108	99	130
7	perdidos af	37	4	3	0	2	28	207	4	36	0	0	52	205	73	67	21	68	1	194
8	ssr nov	0	3	7	8	6	6	41	4	1	20	14	28	15	20	26	17	23	20	35
9	ssr tot	18	4	12	10	10	7	54	6	2	25	17	31	18	22	29	22	26	23	38
10	perdido ssr	38	18	0	0	0	39	48	1	4	0	35	19	4	0	34	17	134	22	256
11	rflp nov	0	13	9	6	10	9	24	14	18	15	13	13	15	18	20	17	18	17	30
12	rf tot	15	23	15	15	19	15	39	24	23	27	24	25	26	29	32	24	31	27	44
13	perdido rf	20	0	5	50	10	12	0	2	0	0	8	4	4	2	2	8	3	4	199
14	totales nov	0	26	30	31	37	33	75	39	38	60	55	58	38	56	78	69	82	74	118
15	totales(af+rf+ssr)	136	112	109	100	103	86	192	100	91	139	128	132	86	121	164	145	165	149	212
16	tot perd	75	22	8	50	12	79	255	7	0	0	43	75	213	75	103	46	205	27	649
17	nov/tot*100	0	23	28	31	36	38	39	39	42	43	43	44	44	46	46	47	49	50	55
18	nov/(tot-nov)*100	0	30	38	44	56	62	64	64	72	76	75	78	79	86	91	90	98	98	119
19	perdidos/tot	0,55	0,2	0,07	0,51	0,12	0,92	1,42	0,07	0	0	0,34	0,6	2,73	0,66	0,64	0,32	1,27	0,19	3,15
20	%perdidos	14,26	4,18	1,52	9,51	1,14	15,02	6,06	1,33	0	0	2,04	4,75	10,12	3,56	3,92	1,75	7,79	1,28	8,81

Con el objeto de evaluar de qué manera el número de alelos no presentes en el cultivar de papa ("novedosos") depende de la ploidía o número de genomas evaluados, se realizaron las siguientes correlaciones.

1. Se correlacionó (para el total de especies simuladas) el número de cromosomas evaluados con el **número de alelos novedosos** obtenidos, dando un valor de $r=0,69$ y cuando se correlacionaron el número de cromosomas evaluados con el **número total de alelos** el valor fue de $0,72$.
2. Cuando se eliminó del conjunto total de datos (diploides y poliploides) al taxón *S. tuberosum ssp andígena* (que por pertenecer a la misma especie que la papa cultivada es el taxón genéticamente más relacionado y podría estar afectando la correlación), dicho coeficiente no mostró cambios respecto del total ($r=0,70$).
3. En cambio, cuando se eliminó del análisis a *S. oplocense* y *S. gourlayi*, este coeficiente ascendió a $0,78$.
4. Correlacionando únicamente los datos de las especies simuladas diploides, el valor ascendió a $0,93$. Es decir, que en el caso de las especies diploides, este valor sí está muy regulado por el número de cromosomas evaluados.

Como puede apreciarse, existen algunas excepciones de importancia a la regla general que muestra que el número de alelos novedosos está correlacionado con el número de genomas evaluados. Estas excepciones están representadas, fundamentalmente, por *S. oplocense* y *S. gourlayi*, especies poliploides que tienen una cantidad sensiblemente menor de alelos novedosos que las otras especies de igual ploidía. Como se mencionó más arriba, estas diferencias podrían reflejar una historia evolutiva diferente en las especies analizadas (por ejemplo diferencias temporales en los momentos en que se produjeron las poliploidizaciones, incorporación en tiempos distintos de alguno de los genomas, etc.). Esto es un fenómeno ya conocido para otras especies poliploides. Por ej. el genoma D del trigo hexaploide muestra un número sensiblemente menor de alelos que los genomas A y B.

En la colza cultivada ocurre, también, algo parecido en el sentido de ser un alopoloide con diferente grado de variabilidad según el genoma componente.

Del análisis comparativo entre distintos marcadores moleculares pudo observarse que los cambios de proporción (aumento relativo de bandas diferenciales y disminución de las compartidas) fueron, proporcionalmente, más acentuados para RFLP y SSR, que para los AFLP; sugiriendo que los marcadores evalúan distintas modalidades de evolución de las secuencias que detectan. El comportamiento de los AFLPs respecto a los RFLP no es un resultado esperado, ya que se considera que los primeros serían marcadores de evolución más lenta que los SSR pero más rápida que los RFLP. Esto indica que los fragmentos que son detectados mediante AFLP no son tan variables como los generados por las otras técnicas y los mismos podrían ser consecuencia de que, en este grupo taxonómico, la tasa de mutación puntual es, en términos relativos, menor que la tasa de mutaciones por rearrreglos estructurales (deleciones, inversiones e inserciones, las que serían detectadas principalmente mediante RFLP). En este contexto, resulta de interés analizar las utilidades relativas que pueden tener estas herramientas moleculares.

Volviendo al análisis de la variabilidad presente en el germoplasma de papa que no forma parte de este cultivo y que serviría para aumentar la base genética para su mejoramiento, resulta de interés resaltar que los microsatélites fueron los que detectaron mayores diferencias entre los dos grupos, y tanto AFLP como RFLP tuvieron una capacidad de discriminación similar (**tabla 29**). Considerando a los microsatélites en forma individual fue posible cuantificar, en cada especie, el número de alelos novedosos respecto de papa. Los resultados se muestran en la **Tabla 35**.

4.7.1. Alelos novedosos de cada microsatélite en taxones simulados

Para conocer la información de los distintos microsatélites en cuanto a su novedad respecto del cultivar Huinkul MAG, se evaluaron los alelos novedosos como en el caso anterior, para cada *locus* estudiado (**Tabla 35**). *S. goniocalyx*, *S. phureja*, *S. verrucosum*, *S. vernei* y *S. megistacrolobun* mostraron tener la menor

diferencia con el cultivar de referencia evaluado para el total de los microsátélites. En contraposición, en muchos de los casos se observó que existía 100% de alelos novedosos.

Tabla 35: Cantidad y porcentaje de alelos novedosos (ausentes en el cultivar Huinkul MAG) respecto del total de alelos presentes por taxón simulado (evaluados para cada microsátélite). En cada casilla se indica el número absoluto de alelos novedosos y debajo, el porcentaje que representa en ese taxón dicho número. En la última fila se indica el número total de alelos novedosos y su porcentaje.

#	14	5	5	4	3	2	5	4	1	1	1	1	1	5	4	4	8
Taxón	chc	cmm	kiz	tar	spg	Mga	Mcd	Vnt	vrn	ifd	Gon	Verr	phu	grl	opl	acl	adg
so15	5	1	4	5	6	1	4	0	2	0	0	1	0	7	4	7	13
%	100	100	100	100	100	100	100	0	100	0	0	100	0	100	100	100	100
so9	nulo	Nulo	1	4	2	3	7	4	2	2	3	1	1	5	3	4	9
%			100	100	100	100	100	100	100	100	100	50	100	100	100	100	75
so24	8	1	2	2	3	1	3	1	1	1	0	1	0	2	2	1	4
%	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	0	100	0	100	100	100	80
so26	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
%	50	0	50	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0#	0	0	0
so11	5	1	5	1	3	1	5	4	1	1	1	0	1	7	3	5	8
%	100	50	100	100	100	100	100	100	100	100	33	0	100	88	100	100	80
so6	5	5	2	2	1	0	nulo	1	1	1	1	0	1	2	1	1	2
%	100	100	100	67	33	0		100	100	100	100	0	100	100	100	100	50
so10	10	7	8	6	5	0	6	4	1	1	2	1	0	5	2	2	5
%	83	70	80	86	71	0	75	67	50	50	67	100	0	71	50	67	63
total	35	17	23	20	20	6	26	14	8	6	7	4	3	28	15	20	41
	92	77	88	87	80	60	90	82	80	86	58	67	75	90	83	91	76

4.8. Grado de homocigosis de las entradas

El porcentaje de homocigosis de cada entrada se estimó a partir de los *loci* de RFLP y SSR que tuvieron una única banda en cada genotipo respecto del total de *loci* evaluados. Como puede observarse en la **tabla 36**, la entrada que mostró mayor porcentaje de homocigosis fue *S. goniocalyx* y *S. megistacrolobun* 3787 y la más heterocigota, *S. spegazzinii* 6108, (menos de 20 % de datos perdidos), dando cierta imprecisión al cálculo. La variedad de tomate analizada (cv. platense), tuvo un 45% de homocigosis con 30% de datos perdidos (el porcentaje si bien es bajo, por tratarse de una variedad de un cultivo autógamo, también se sabe que se trata de un cultivar argentino antiguo y muy heterogéneo, por lo que no se descarta que

demuestre poseer varios alelos por gen -ya se ha visto para varios caracteres fenotípicos e isoenzimas- y además debe considerarse que la medición aquí efectuada posee bastante error debido al relativamente alto número de datos perdidos. En la **tabla 36** se detallan en orden decreciente de homocigosis las entradas junto a sus respectivos porcentajes calculados en base a datos de RFLP y SSR. Debido a la gran subestimación de este método de evaluación en los citotipos poliploides, se describen únicamente los porcentajes estimativos de homocigosis de las especies diploides

Tabla 36: Porcentaje de homocigosis en las entradas diploides de *Solanum*. En la primera columna se indican los genotipos, en la segunda los porcentajes de datos perdidos y en la tercera los porcentajes estimativos del grado de homocigosis de cada entrada estimado mediante RFLP y SSR (22 loci). Se resaltan en **negrita** a porcentajes que se calcularon con menos de un 20% de datos perdidos.

Geotipo	%perd	% Hom	Geotipo	% perd	% Hom
Goniocalyx	14	64	Chc4957c	14	45
Mga3787	19	64	Cmm7310	29	45
Tar5882	29	64	Mcd4398	24	45
Cmm7313	33	59	Spg6147	19	45
Ktz4986	24	59	Tar5633	29	45
Cmm7270	24	55	Tar5891	24	45
Grl4837	19	55	tomate	29	45
Ktz4937	14	55	Chc48101	38	41
Ktz4946	24	55	Chc48102	33	41
Ktz4964	24	55	Chc49572	19	41
Ktz4971	24	55	Chc49573	24	41
Mcd6881	24	55	Chc6116c	43	41
Vnt7585	24	55	Mcd7493	19	41
Vnt7609	24	55	Mcd7634	14	41
Vnt7618	24	55	Phureja	29	41
Vnt7619a	14	55	Spg4201	19	41
Chc2955c	19	50	Verruco	29	41
chc5341m	19	50	Chc29552	29	36
Cmm7254	38	50	Chc75463	52	36
Cmm7292	29	50	Mcd7530	14	36
lfd	33	50	Spg6108	19	36
Mga7504	48	50	Chc73091	33	32
Opl3964	29	50	Chc7546	67	32
Tar5889	38	50	Chc5611m	62	27
Chc4957	24	45	Vm7617	62	23

4.9. Índices de Contenido polimórfico promedio

Con el fin de estimar la capacidad de los diferentes marcadores moleculares para detectar variabilidad genética, se calcularon los PICs según lo explicado en Materiales y Métodos (sección análisis de datos) y de acuerdo a lo descrito por Powell y Rafalski *et al.* (1996) y Milbourne *et al.* (1997).

Los índices más altos de polimorfismo promedio se evidenciaron con la técnica de SSR (PIC = 0,720 y 0,435) para los citotipos diploides y poliploides, mientras que la técnica de RFLP arrojó los índices promedios más bajos (PIC = 0,240 y 0,258). En el caso de los AFLP, los índices fueron relativamente más altos (PIC = 0,307 y 0,332) que para los RFLP para ambos grupos de citotipos, (aunque no se detectaron diferencias significativas). Estos datos se resumen en la **tabla 37**.

Tabla 37: Índices de contenido polimórfico promedio y sus desviaciones estándar para los distintos marcadores moleculares.

	GENOTIPOS DIPLOIDES	GENOTIPOS POLIPLOIDES
RFLP	0,240 ± 0,1493	0,258 ± 0,1345
AFLP	0,307 ± 0,1400	0,332 ± 0,1378
SSR	0,720 ± 0,3076	0,435 ± 0,2563

Se calculó para cada locus (Milbourne *et al.*, 1996) según la fórmula:

$$1 - \sum p_i^2$$

Siendo p_i la frecuencia de la presencia del alelo i en los genotipos analizados, como se mencionó anteriormente.

Tanto para el caso de AFLP como de RFLP cada banda fue considerada como perteneciente a un *locus* distinto (e independiente). En el caso de RFLP, esta consideración implica que los valores calculados seguramente sobreestiman al valor del PIC, debido a que cada sonda suele hibridar con varios fragmentos de restricción (bandas) pertenecientes al mismo *locus* o eventualmente a *loci* genéticamente ligados (como sugiere la sonda TG479(3) (**tabla 22**), que revela un elevado número de bandas). Este podría ser un típico caso de una sonda conteniendo secuencias codificantes, las cuáles hibridan con todos los

miembros de una familia multigénica, por lo que estos *loci* no serían independientes entre sí. Como no es posible determinar cuáles bandas son alélicas entre sí (se requerirían de cruzamientos y estudios de segregación), se asume el error en el cálculo del PIC. En el caso de AFLP también se producirán algunos casos de falta de independencia por ligamiento genético de los *loci* detectados, pero el error es mucho menor que para RFLP. En cambio, en los SSR se parte de la consideración de que todas las bandas visualizadas a partir de la amplificación con un par de primers pertenecen *a priori* al mismo *locus*, a pesar de que hay casos en los cuales se observó que existen más bandas que las que podrían esperarse, por lo que debe haber más de un *locus* involucrado. Los datos individuales de los microsatélites se muestran en la **Tabla 27**.

La **tabla 37** nos indica que los valores obtenidos con RFLP y AFLP oscilan entre 0,24 y 0,31 siendo los valores correspondientes a RFLP un poco menores que los AFLP pero no tanto como era de esperar del comportamiento relativo de estos marcadores en otros sistemas. Más aún, a pesar de las diferencias mencionadas entre los valores medios de RFLP y AFLP, estas diferencias entre los dos tipos de marcadores no fueron estadísticamente significativas, independientemente del nivel de ploidía analizado. Resulta de interés destacar que no se detectaron diferencias entre los valores de PIC comparando distintos niveles de ploidía para estos dos tipos de marcadores.

En cambio, al igual que lo que ocurre en otros sistemas biológicos, claramente se observa la gran capacidad de discriminación de los microsatélites. Esto es particularmente destacable, considerando que dentro de los valores promediados, el microsatélite SO24, tuvo un índice de 0,04 para los citotipos diploides y 0 para los poliploides, disminuyendo en forma considerable el valor promedio global.

4.10. Correspondencia entre los sistemas

Para conocer la concordancia que existe entre los distintos marcadores moleculares utilizados, se analizaron las correlaciones entre las matrices de similitud generadas por cada método (**Tabla 39**). También se correlacionaron las matrices cofenéticas entre sí. Todas las correlaciones fueron significativas

estadísticamente ($p < 0,001$ para las especies diploides y $p < 0,0001$ para las poliploides). Sin embargo estos valores de significancia fueron elevados, en parte, debido a que el número de datos es muy alto ($n=1225$ y $n=1128$ para las OTUs diploides y $n=171$ y $n=153$ para las OTUs poliploides, con y sin el OTU grupo externo en todos los casos y $n=2211$ para el total de OTUs, sin incluir al grupo externo).

Con el objeto de evitar que los grupos externos acentúen la correlación (descrito en Powell et al, 1996), los mismos fueron considerados (o no) y los valores de r obtenidos en cada caso se detallan en la **Tabla 39**. Sin embargo, pudo comprobarse que los grupos externos, solamente redujeron los coeficientes de correlación en el caso de los poliploides, ya que en los citotipos diploides y el conjunto de todos los citotipos las diferencias encontradas fueron no significativas

Los coeficientes obtenidos con las tres herramientas se detallan en la **tabla 39**. Se analizaron las ploidías por separado y también en forma conjunta. Los valores de correlaciones en los citotipos diploides (corregidos, es decir sin considerar Huinkul MAG ni tomate) fueron desde 0,510 (RFLP vs SSR), 0,552 (RFLP vs AFLP), 0,640 (AFLP vs SSR). Considerando todos los citotipos independientemente de la ploidía, los valores oscilaron desde 0,441 (RFLP vs SSR), 0,505 (RFLP vs AFLP) a 0,629 (AFLP vs SSR) sin considerar el grupo externo de referencia (tomate).

Al agrupar a todos los citotipos en una única matriz, (**tabla 39 C**), los valores disminuyeron, no obstante, las correlaciones siguieron siendo significativas. En un extremo los RFLP correlacionaron con los SSR, mostrando los menores valores (0,528; 0,587 y 0,441 para los citotipos diploides, poliploides y totales respectivamente), y en el otro los datos obtenidos mediante AFLP correlacionaron con los SSR dando los mayores valores (0,640; 0,777 y 0,605 para los citotipos diploides, poliploides y totales respectivamente). Las correlaciones entre los marcadores generados a través de AFLP y RFLP mostraron valores intermedios (0,556; 0,703 y 0,505) para los citotipos diploides, poliploides y totales respectivamente). Como puede observarse, los valores más altos se obtuvieron con los genotipos poliploides, quizás debido al gran número de datos respecto de las OTUs evaluadas. En la **fig. 34** se muestran los gráficos

de las correlaciones entre las matrices de similitud de todos los genotipos entre todos los marcadores.

A pesar de que las correlaciones entre AFLP y Microsatélites fueron bajas aunque significativas según (Rohlf, 1990), sus valores superaron a los obtenidos en soja (Powell, 1996) y en cultivares de papa (Milbourne et al, 1997).

Los marcadores moleculares detectan componentes de la variabilidad que difieren entre sí tanto en su mecanismo de generación (mutaciones puntuales por un lado, rearrreglos estructurales por el otro y deslizamientos de la ADN polimerasa por el tercero), como en su velocidad de fijación en el transcurso de la evolución. Por lo tanto, las correlaciones bajas son esperables, dado que estarían reflejando dichas diferencias. A pesar de esto, las correlaciones entre AFLP y SSR fueron bastante altas considerando a los citotipos diploides; y en los tetraploides, los valores de r fueron superiores y muy similares unos a otros con los tres sistemas.

Tabla 39: Comparación de matrices mediante coeficientes de correlación producto-momento (Pearson). Matriz superior (cursiva): correlaciones entre matrices cofenéticas. Matriz inferior: correlaciones entre matrices de similitud. Datos subrayados: correlaciones sin grupos externos (ver texto).

En negrita: coeficientes de correlaciones cofenéticas (fenogramas y matrices de similitud, incluyen a Huinkul MAG y tomate).

A citotipos diploides, B tetraploides., C: todos los citotipos

A

n=1225/1128	RFLP	AFLP	SSR
RFLP	0,78	<i>0,664</i> <u>0,567</u>	<i>0,641</i> <u>0,496</u>
AFLP	0,552 <u>0,556</u>	0,92	<i>0,736</i> <u>0,698</u>
SSR	0,510 <u>0,528</u>	0,640 <u>0,6378</u>	0,85

B

n=171/153	RFLP	AFLP	SSR
RFLP	0,94	<i>0,497</i> <u>0,449</u>	<i>0,478</i> <u>0,495</u>
AFLP	0,781 <u>0,703</u>	0,97	<i>0,851</i> <u>0,789</u>
SSR	0,631 <u>0,587*</u>	0,777 <u>0,764</u>	0,97

C

n=2211	RFLP	AFLP	SSR
RFLP			
AFLP	0,508 <u>0,505</u>		
SSR	0,441 <u>0,441</u>	0,605 <u>0,629</u>	

Los valores de las correlaciones disminuyeron cuando se consideraron todos los citotipos juntos. Si bien no existe una explicación clara a este com-

portamiento, posiblemente pese el hecho de que se están comparando entre sí especies con dinámicas e historias evolutivas distintas en las que el cambio de ploidía esté implicado (especies recientes -sobre todo entre las poliploides- con especies más antiguas -mayoría de las diploides-).

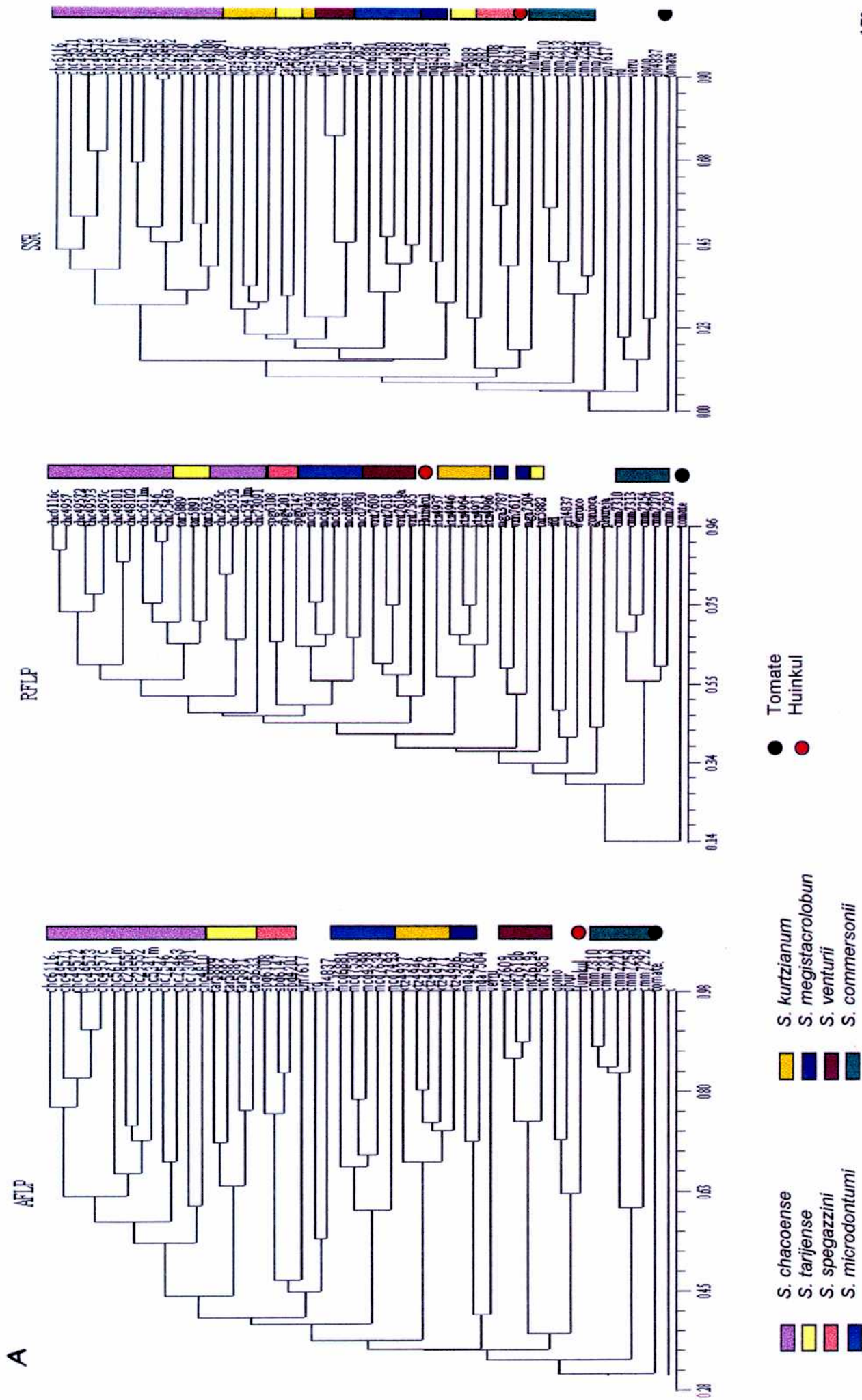
4.11. Dendrogramas de las especies analizadas

4.11.1. Dendrogramas generados mediante cada técnica molecular por separado

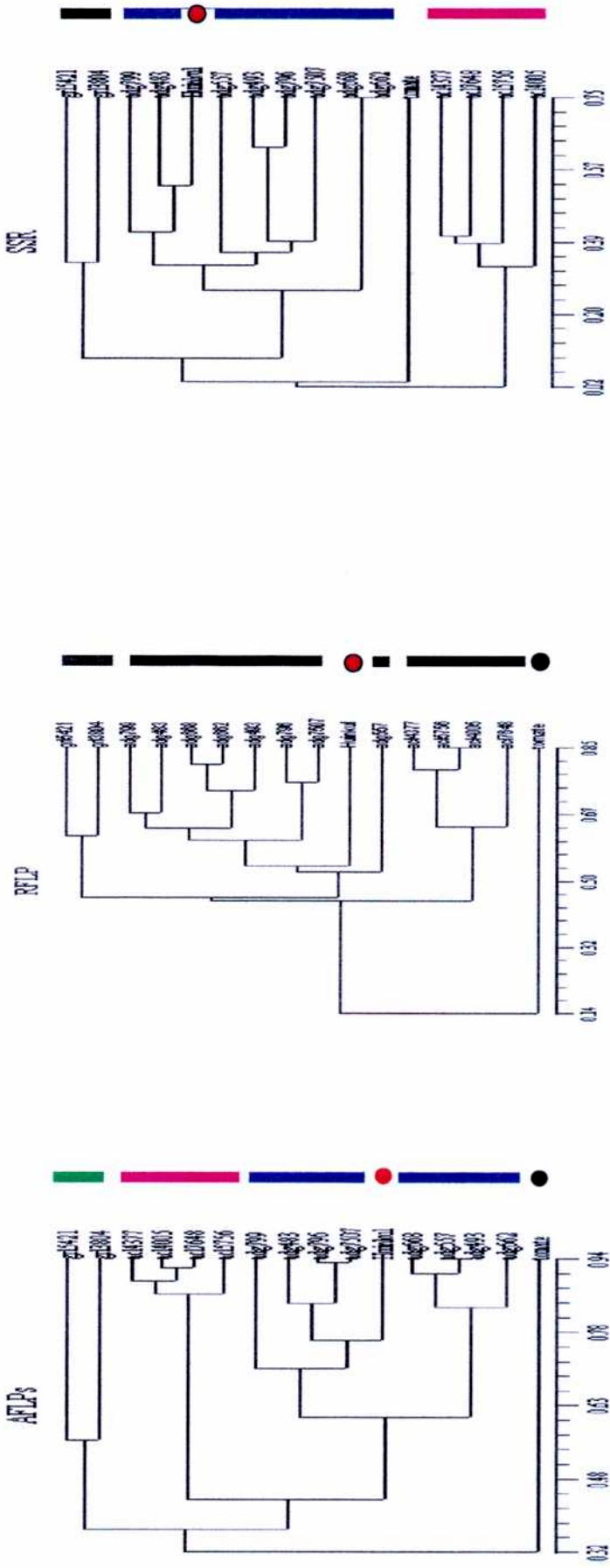
Con los datos obtenidos con cada una de las herramientas y codificadas en la MBD según se indicó previamente, utilizando el programa NTsys y el índice de Jaccard, se construyeron los dendrogramas de las especies empleando UPGMA como método de ligamiento. Se crearon en total 6 árboles correspondientes a las 3 técnicas (AFLP, RFLP y SSR) y a los distintos citotipos (diploides y tetraploides). (Fig. 33 A y B)

En este caso se consideró a cada genotipo como OTU y a cada banda polimórfica como variable. Se construyeron matrices por separado según los niveles de ploidía, obteniendo una para diploides y otra para poliploides. Se decidió separar las matrices según el grado de ploidía, con el objeto de no incrementar la similitud entre las OTUS diploides. Este fenómeno podría ocurrir si existieran entre los genotipos poliploides, híbridos de los genotipos diploides

Fig. 33. Dendrogramas de las especies con los tres marcadores moleculares utilizados. A: diploides, B: tetraploides. Se utilizó el Índice de similitud Jaccard, método de agrupamiento SHAN con ligamiento promedio (UPGMA). En el eje inferior se indican los valores de similitud a los que se unen los taxones en estudio. Las barras de colores distinguen las distintas especies.

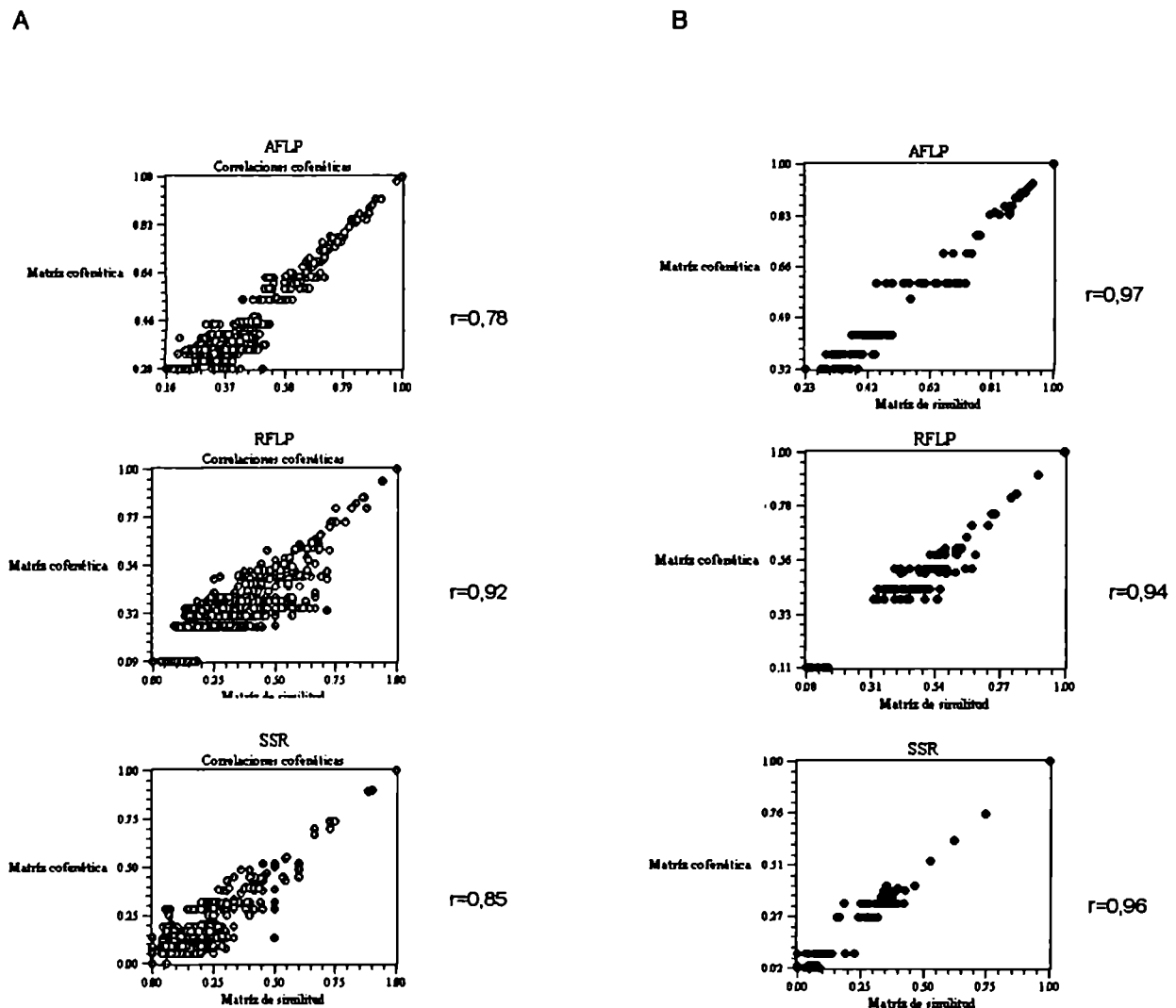


B



La distorsión de cada uno de los fenogramas se estimó mediante el coeficiente de correlación cofenético ($r_{AFLP}=0,92$ y $0,97$ $r_{RFLP}=0,81$ y $0,94$ y $r_{SSR}=0,85$ y $0,97$ para diploides y tetraploides respectivamente) **Tabla 39** y **Fig. 34**.

Fig.34: Correlaciones cofenéticas. **A:** genotipos diploides y **B** genotipos tetraploides. Se indican los resultados obtenidos con los 3 marcadores moleculares desarrollados y sus coeficientes de correlación cofenéticos en cada caso. En el eje x, se representaron las matrices de similitud y en el eje y, las matrices cofenéticas.



En todos los casos puede observarse que las entradas de una misma especie se agruparon con índices de similitudes mayores que entre especies (con algunas excepciones en RFLP), lo que indica que los marcadores permiten un agrupamiento coherente con el esperado de la taxonomía de este género. Otra apreciación que surge de la observación de los mismos, es que los valores de similitud **entre** especies, son relativamente cercanos unos a otros, lo que por un lado confirma que se trata de especies de evolución reciente y que guardan aún mucha similitud entre sí, pero por otro lado, esta

similitud puede producir errores en la estimación de las relaciones entre especies. Este fenómeno también se observa cuando se construyen los taxones simulados, para ver la relación entre especies (**Fig. 38**) ya que no se conserva la agrupación de los taxones con las distintas metodologías.

4.11.2. Dendrogramas generados mediante todas las técnicas moleculares conjuntamente

Observando los coeficientes de correlación entre los distintos sistemas (**Fig. 32 y tabla 39**), los datos obtenidos mediante las tres herramientas mostraron un ajuste similar, por tal motivo, se evaluaron a las OTUs con el total de los datos aportados por las tres metodologías, totalizando 526 variables. Se construyeron las matrices de similitud y dendrogramas para cada ploidía y se graficaron (**Fig. 35 A y B.**). Para este conjunto de datos se calcularon los coeficientes de correlación cofenéticos que fueron de 0,93 y 0,97 para diploides y tetraploides respectivamente.

Tanto en diploides como en poliploides se respetaron los agrupamientos de las entradas de una misma especie con mayor similitud que entre especies, si bien era previsible dados los datos obtenidos de manera individual con cada herramienta. Los valores de similitud promedio entre ellas se aproximaron a los descritos en la tabla 40A. También se verificó que las entradas tetraploides poseen mayor similitud genética **dentro** que las entradas diploides, principalmente *S. acaule*, como puede apreciarse en los valores de similitud **dentro** expresados en la tabla similitud dentro. En los dos árboles se observa que el grupo externo tomate, muestra la posición más alejada del resto; siguiendo al mismo en términos de mayor similitud genética se encuentra *S. commersonii* en el grupo de las especies diploides y *S. gourlayi* en el de las tetraploides. El cultivar Huinkul MAG, se posicionó próximo al grupo integrado por *S. goniocalyx* y *S. phureja* entre los diploides, y agrupada con un grupo de clones de *S. tuberosum ssp. andigena* entre las tetraploides. *S. tarjense* mostró mayor cercanía con *S. chacoense*, ambas descritas en la misma serie taxonómica como se mencionó anteriormente. Todas estas observaciones concuerdan con las ubicaciones taxonómicas propuestas por Hawkes (1989).

Respecto a la coherencia con la ubicación geográfica, se observaron algunos ejemplos como en el caso de *S. ventuni* 7618A y 7619B, *S. tarjense* 5889 y 5882, y *S. acaule* 5756 y 4005. Del mismo modo, pero dentro de entradas, se agruparon los individuos de *S. chacoense* 7546, 4957 y 2955.

Con referencia a los clones de *S. tuberosum ssp. andigena* que mostraron mayor cercanía con el cultivar Huinkul MAG, dicha asociación no se vio vinculada por la procedencia geográfica. (Tabla 3).

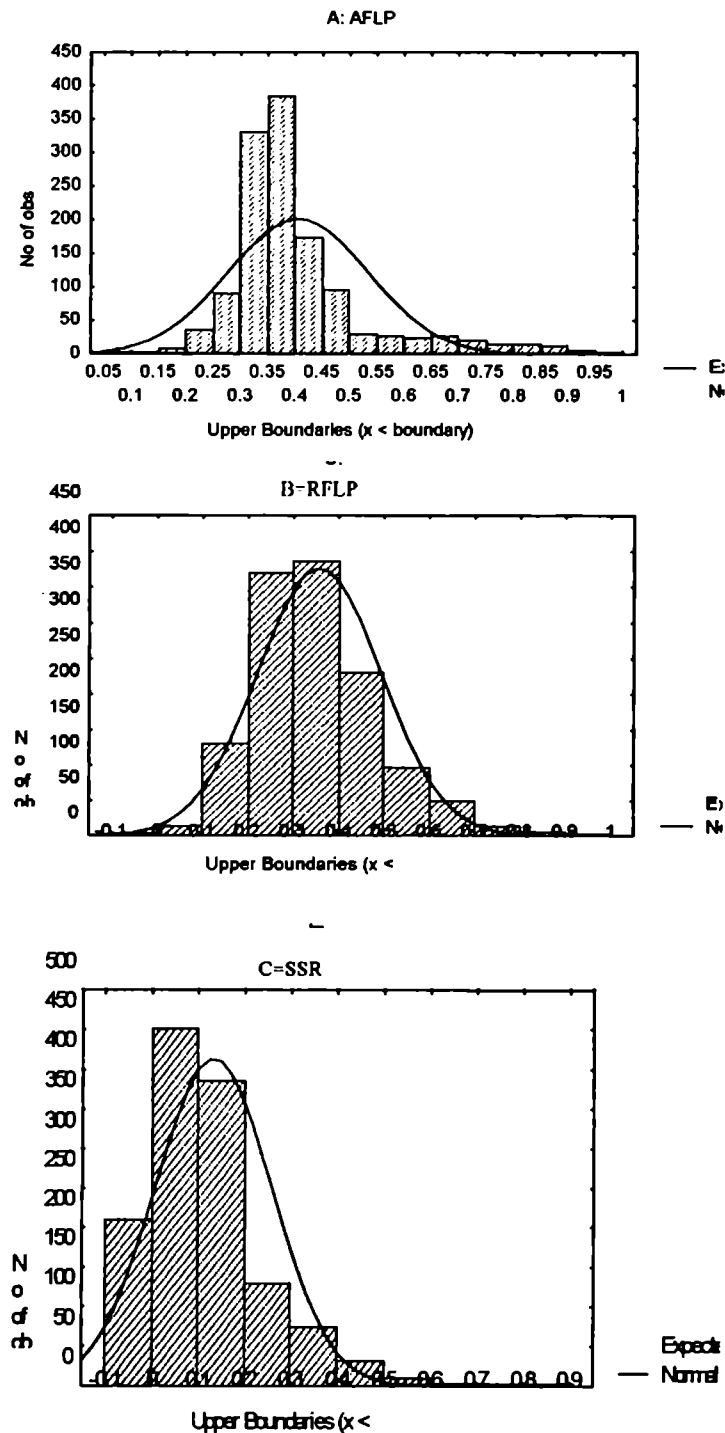
4.12. Distribución de los índices de similitud

Para observar gráficamente la distribución de los índices de similitud entre todos los individuos generados con cada marcador molecular, se construyó un histograma (Fig. 36) con todos los índices de similitud entre todos los pares de OTUs, eliminando el grupo externo tomate, por ser considerado como grupo externo de referencia.

Se puede apreciar que su distribución es de tipo normal para AFLP y SSR y que los valores promedio disminuyen cuando pasamos de AFLP a RFLP a SSR.

Fig. 36. Histograma de los índices de similitud de *Solanum* sp.

A: Distribución de los índices de similitud generados mediante AFLP. B: Distribución de los índices de similitud generados mediante RFLP. C: Distribución de los índices de similitud generados mediante SSR. Se observa el decrecimiento de los valores promedio hacia los valores de menor similitud desde AFLP a RFLP a SSR.



4.13. Índices de similitud promedio dentro de especies

Para evaluar la mayor o menor similitud genética que existe en las distintas especies, se calcularon los valores promedios de los índices de similitud dentro de cada especie y entre especies. En la **Tabla 40 A**, se detallan los resultados obtenidos. Como puede observarse, la técnica de AFLP mostró menor sensibilidad para detectar variación dentro de especies respecto de RFLP. En cambio y como se esperaba, SSR fue la más discriminante a este nivel, con la excepción de *S. venturii* cuyos valores superaron a los de RFLP.

Utilizando AFLP, el índice de similitud promedio más bajo, correspondió a *S. chacoense*, (0,587) y el más alto a *S. acaule* (0,880); mediante RFLP en cambio, el de menor valor correspondió a *S. spegazzinii* (0,509) y el de mayor índice correspondió también a *S. acaule* (0,727). Utilizando SSR, *S. gourlayi* tuvo el menor valor (0,145) y *S. venturii* el mayor (0,622). Promediando todos los índices obtenidos con los tres métodos, la especie que tuvo menor variabilidad fue *S. venturii* (0,681) y la de mayor variabilidad *S. gourlayii* (0,411). En la **fig.37**, pueden observarse gráficamente estos resultados. Si bien se detectaron valores mayores y menores, todos estaban muy próximos unos a otros. (RFLP y AFLP)

Fig. 37. Coeficientes de similitud dentro de especies con las tres herramientas. Se calcularon para las especies que se evaluaron al menos dos entradas como por ej. *S. megistacrobium*.

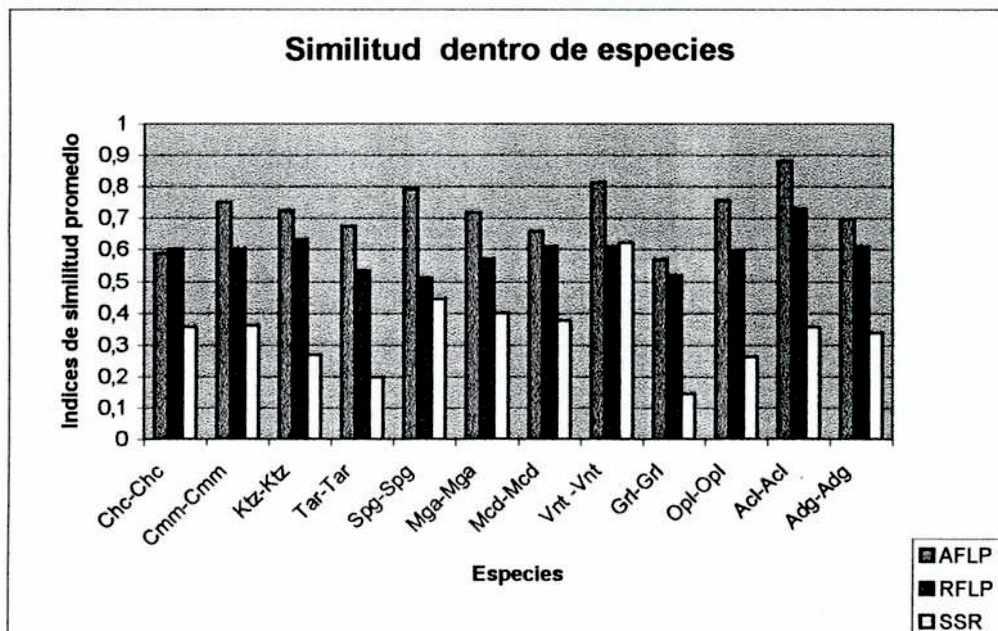


Tabla 40: Coeficientes de similitud promedio dentro y entre especies.

A: Coeficientes de similitud promedio (csp) y desvío estándar de cada una de las especies calculados a partir de cada marcador molecular. En el caso de *S. megistacrolobun*, solamente dos entradas fueron computadas y por lo tanto carece de desviación standard. Subrayados se indican los valores mayores y menores para cada tipo de marcador.

	AFLP		RFLP		SSR		Total	
	prom	ds	prom	ds	prom	ds	prom	ds
<i>Chc-Chc</i>	0,587	0,135	0,604	0,124	0,357	0,161	0,516	0,272
<i>Cmm-Cmm</i>	0,749	0,130	0,602	0,076	0,360	0,085	0,570	0,354
<i>Ktz-Ktz</i>	0,723	0,047	0,630	0,076	0,269	0,051	0,541	0,350
<i>Tar-Tar</i>	0,674	0,068	0,539	0,113	0,198	0,099	0,470	0,293
<i>Spg-Spg</i>	0,790	0,044	<u>0,509</u>	0,110	0,443	0,092	0,581	0,342
<i>Mga-Mga</i>	0,717		0,571		0,400		0,429	0,159
<i>Mcd-Mcd</i>	0,658	0,069	0,617	0,086	0,376	0,079	0,550	0,319
<i>Vnt -Vnt</i>	0,812	0,071	0,610	0,068	<u>0,622</u>	0,201	<u>0,681</u>	0,385
<i>Gri-Gri</i>	<u>0,568</u>	0,091	0,521	0,074	<u>0,145</u>	0,128	<u>0,411</u>	0,273
<i>Opl-Opl</i>	0,756	0,077	0,596	0,128	0,263	0,010	0,538	0,326
<i>Acl-Acl</i>	<u>0,880</u>	0,024	<u>0,727</u>	0,101	0,356	0,046	0,654	0,413
<i>Adg-Adg</i>	0,697	0,132	0,613	0,097	0,338	0,117	0,549	0,325

4.14. Índices de similitud promedio entre especies

Por otro lado, se calcularon los índices de similitud promedio de cada especie, con el resto de las especies del mismo grupo de ploidía. Para AFLP se observaron valores que oscilaron desde 0,323 para *S. gonio calyx* hasta 0,406 para el cv. Huinkul MAG. (Tabla 40 B).

Para RFLP, la especie más diferente del resto fue nuevamente *S. gonio calyx* (0,216) y la más semejante *S. vernei* (0,452) (Tabla 40 B). Con SSR todos los valores fueron muy bajos.

Las comparaciones entre los genotipos poliploides, reflejaron mayor similitud entre ellos. Nuevamente Huinkul MAG, tuvo el valor máximo dentro del grupo (0,467) y el mínimo correspondió a *S. tuberosum ssp. andígena* (0,4), aunque todos los valores fueron muy similares. Con RFLP, *S. gourlayi* tuvo mayor similitud con el resto (0,506) y Huinkul MAG tuvo la menor similitud.

Mediante SSR, la más semejante fue Huinkul MAG y la más distante, *S. acaule*.

En el total del germoplasma pudo observarse (Tabla 40 C), que Huinkul MAG tuvo el mayor índice promedio para AFLP y *S. commersonii* el menor. Con RFLP, *S. vernei* tuvo el máximo y *S. commersonii* el mínimo.

Tabla 40B: Coef de similitud promedio y desv. standard entre especies, calculados con cada marcador molecular y separados por niveles de ploidía.

Diploides	AFLP		RFLP		SSR	
	Prom	var	Prom	var	Prom	Var
<i>Chc -</i>	0,360	0,072	0,328	0,108	0,103	0,075
<i>Cmm -</i>	0,347	0,098	0,249	0,071	0,068	0,056
<i>Ktz -</i>	0,359	0,051	0,299	0,091	0,134	0,085
<i>Tar -</i>	0,397	0,059	0,325	0,098	0,103	0,073
<i>Spg-</i>	0,378	0,079	0,373	0,107	0,098	0,048
<i>Mga-</i>	0,347	0,036	0,305	0,097	0,128	0,070
<i>Mcd-</i>	0,357	0,054	0,364	0,094	0,127	0,062
<i>Vnt-</i>	0,338	0,039	0,291	0,088	0,126	0,082
<i>Vm7617</i>	0,392	0,107	0,452	0,079	0,055	0,079
<i>Ifd</i>	0,401	0,097	0,296	0,073	0,044	0,073
<i>Gonio</i>	0,323	0,073	0,216	0,096	0,059	0,096
<i>Verru</i>	0,403	0,048	0,327	0,122	0,059	0,122
<i>Phur</i>	0,404	0,094	0,294	0,087	0,083	0,087
<i>Huinkul</i>	0,406	0,088	0,342	0,079	0,09	0,079
<i>Tomate</i>	0,303	0,051	0,088	0,067		

Poliploides						
<i>Grl-</i>	0,408	0,091	0,506	0,094	0,08	0,059
<i>Opl-</i>	0,416	0,086	0,495	0,103	0,067	0,049
<i>Acl-</i>	0,424	0,042	0,422	0,060	0,032	0,041
<i>Adg-</i>	0,4	0,050	0,469	0,088	0,049	0,048
<i>Huinkul</i>	0,467	0,075	0,39	0,087	0,193	0,054
<i>Tomate</i>	0,304	0,068	0,114	0,096		

En todos los casos se observó que los índices de similitud promedio dentro de las especies fue superior al índice entre especies, ya sea cuando se compararon dentro del mismo nivel de ploidía o con el total de los individuos.

Los índices de similitud promedio entre especies poliploides entre sí, fueron mayores que los que se observaron entre las especies diploides entre sí para el caso de AFLP.

Tabla 40C: Coeficiente de similitud promedio entre especies, calculados con cada marcador molecular y con todos los citotipos independientemente del nivel de ploidía.

SIMILITUDES PROMEDIO ENTRE TODAS LAS ESPECIES ESTUDIADAS

	AFLP	RFLP	SSR
<i>Chc~</i>	0.352	0.360	0.087
<i>Cmm~</i>	<u>0.319</u>	<u>0.250</u>	0.064
<i>Ktz~</i>	0.349	0.301	0.115
<i>Tar~</i>	0.387	0.334	0.093
<i>Spg~</i>	0.369	0.392	0.091
<i>Mga~</i>	0.344	0.316	0.122
<i>Mcd~</i>	0.356	0.392	0.113
<i>Vnt~</i>	0.340	0.310	0.114
<i>Vm7617</i>	0.396	0.482	0.051
<i>lfd</i>	0.411	0.296	0.044
<i>Gonio</i>	0.349	0.229	0.077
<i>Verru</i>	0.347	0.327	0.053
<i>Phur</i>	0.387	0.312	0.078
<i>Grl~</i>	0.411	0.345	0.075
<i>Opl~</i>	0.347	0.422	0.072
<i>Act~</i>	0.363	0.373	0.054
<i>Adg~</i>	0.370	0.382	0.068
<i>Huinkul</i>	0.426	0.355	0.117

4.14. Similitud entre OTUs (especies) simuladas:

Con el objeto de analizar la relación **entre** especies, las mismas se simularon, agrupando en "taxones simulados" a todos los alelos representados en todas las entradas de una misma especie (igualmente que cuando se evaluaron los alelos novedosos respecto del cultivar). Con estos datos se construyeron las matrices de similitud y los dendrogramas correspondientes para cada grupo de ploidía. La matriz de similitud obtenida para especies diploides se muestra en la **Tabla 42** y se destacan los valores mayores y menores de similitud. Los coeficientes de correlación entre ellas fueron bajos, y se resumen en la siguiente **tabla 43**:

Tabla 43: Coeficientes de correlación entre matrices de similitud de especies simuladas, obtenidas mediante las tres herramientas separadas por nivel de ploidía. A: Diploides simuladas y B: Poliploides simuladas

A			
	AFLP	RFLP	SSR
AFLP			
RFLP	0,467		
SSR	0,256	0,165	

B			
	AFLP	RFLP	SSR
AFLP			
RFLP	0,279		
SSR	0,421	0,181	

Los resultados obtenidos con cada uno de los marcadores difirieron tanto en los valores absolutos obtenidos, como en el tipo de agrupamientos a los que condujeron.

Los agrupamientos que evidenciaron mayor coherencia con la clasificación taxonómica clásica fueron los obtenidos con AFLP. Por ej. *S. chacoense* y *S. tarijense* se agruparon y por taxonomía clásica pertenecen a la misma serie taxonómica (*Yungasensa*). Por otro lado, las especies diploides *S. phureja* y *S. goniocalyx*, que son especies domesticadas, mejoradas y cultivadas, se agruparon con el cultivar comercial Huinkul MAG. Entre los poliploides, las dos subespecies de *S. tuberosum*, se unieron con más del 0,75 de similitud. Los dendrogramas se muestran en la **fig. 38**.

Los resultados más extremos fueron los obtenidos con los microsatélites dado que los valores fueron extremadamente bajos. Además del control externo (tomate) del cual se mencionó que estaba fuera de la escala de conservación evolutiva mínima necesaria a nivel de las secuencias de nucleótidos adyacentes a los *loci* para permitir la unión de primers y permitir así detectar bandas amplificadas, varios taxones mostraron índices de 0 (ver **tabla 43C**). Estos resultados indican que estos marcadores hipervariables sólo serían taxonómicamente confiables a distancias evolutivas cercanas (dentro de una subespecie, entre subespecies y entre especies muy emparentadas)

Fig. 38: Dendrograma de las especies simuladas generados mediante UPGMA y el índice de Jaccard. A: especies diploides y B: especies poliploides

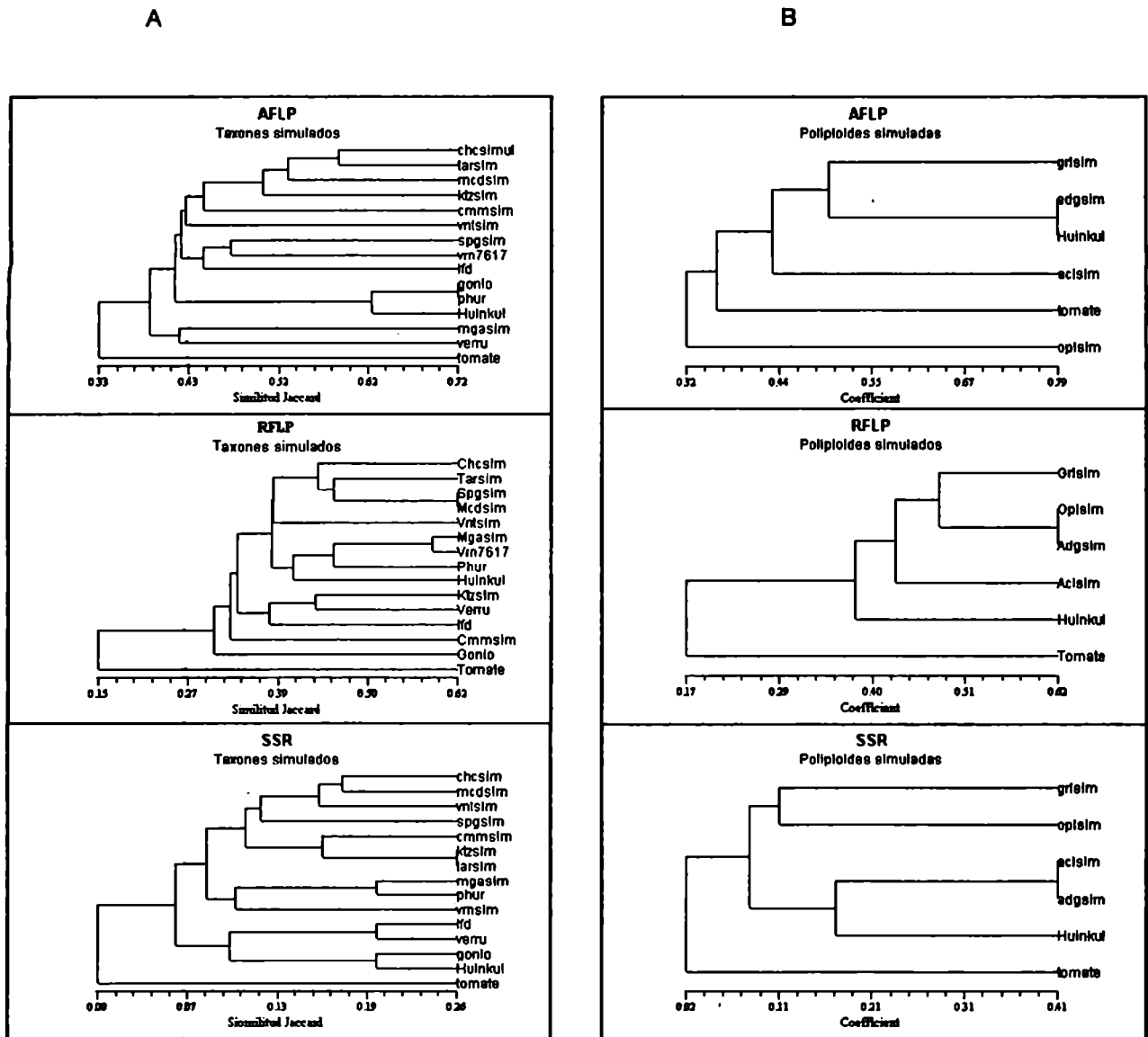


Tabla 42I: Matriz de similitud de todos los taxones diploides simulados.

Cada taxón "simulado" contiene toda la información de los alelos de todas las entradas que pertenecen a dicho taxón. Los taxones *S. vermei*, *S. infundibuliforme*, *S. goniocalyx*, *S. verrucosum*, *S. phureja*, Huinkul MAG y tomate están constituidos por una única entrada. Los índices de similitud corresponden a los calculados utilizando la fórmula de Jaccard. A: Matriz de similitud con datos provenientes de AFLP. B: Matriz de similitud con datos provenientes de RFLP. C: Matriz de similitud con datos provenientes de SSR.

A															
Aflp simul	chc	cmm	ktz	tar	spg	mga	mcd	vmt	vm	ifd	gonio	verru	phu	huink	tomate
chc	1,000														
cmm	0,497	1,000													
ktz	0,532	0,463	1,000												
tar	0,590	0,392	0,529	1,000											
spg	0,432	0,373	0,439	0,497	1,000										
mga	0,401	0,393	0,415	0,392	0,402	1,000									
mcd	0,521	0,415	0,460	0,547	0,443	0,481	1,000								
vmt	0,404	0,387	0,444	0,404	0,394	0,408	0,469	1,000							
vm7617	0,421	0,426	0,408	0,394	0,472	0,374	0,463	0,444	1,000						
ifd	0,417	0,351	0,331	0,423	0,432	0,404	0,431	0,423	0,450	1,000					
gonio	0,394	0,358	0,391	0,349	0,333	0,359	0,338	0,348	0,344	0,351	1,000				
verru	0,400	0,324	0,315	0,355	0,403	0,416	0,382	0,291	0,374	0,408	0,344	1,000			
phu	0,413	0,379	0,409	0,389	0,403	0,364	0,425	0,412	0,424	0,381	0,720	0,371	1,000		
huink	0,494	0,464	0,465	0,443	0,484	0,427	0,526	0,450	0,483	0,442	0,581	0,395	0,670	1,000	
tomate	0,329	0,341	0,309	0,313	0,325	0,336	0,390	0,300	0,297	0,300	0,296	0,290	0,369	0,395	1,000

B															
RFLP simul	chc	cmm	ktz	tar	spg	mga	mcd	vmt	vm	ifd	gonio	verru	phu	huink	tomate
chc	1,000														
cmm	0,328	1,000													
ktz	0,358	0,346	1,000												
tar	0,426	0,294	0,388	1,000											
spg	0,379	0,400	0,358	0,478	1,000										
mga	0,279	0,357	0,283	0,375	0,405	1,000									
mcd	0,508	0,365	0,404	0,438	0,622	0,395	1,000								
vmt	0,299	0,320	0,360	0,362	0,447	0,341	0,408	1,000							
vm7617	0,355	0,350	0,292	0,476	0,500	0,588	0,400	0,476	1,000						
ifd	0,241	0,250	0,361	0,382	0,389	0,219	0,389	0,243	0,294	1,000					
gonio	0,278	0,195	0,316	0,343	0,308	0,345	0,333	0,200	0,429	0,269	1,000				
verru	0,333	0,333	0,435	0,378	0,327	0,233	0,375	0,319	0,250	0,387	0,189	1,000			
phu	0,355	0,313	0,354	0,326	0,413	0,368	0,375	0,298	0,550	0,387	0,433	0,318	1,000		
huink	0,311	0,219	0,394	0,313	0,400	0,360	0,343	0,393	0,500	0,316	0,286	0,357	0,357	1,000	
tomate	0,209	0,111	0,192	0,208	0,170	0,114	0,167	0,137	0,138	0,081	0,077	0,196	0,122	0,152	1,000

C															
SSR simul	chc	cmm	ktz	tar	spg	mga	mcd	vmt	vm	ifd	gonio	verru	phu	huink	tomate
chc	1														
cmm	0,132	1,000													
ktz	0,123	0,171	1,000												
tar	0,151	0,154	0,256	1,000											
spg	0,105	0,093	0,085	0,091	1,000										
mga	0,067	0,143	0,091	0,100	0,094	1,000									
mcd	0,175	0,063	0,078	0,061	0,174	0,147	1,000								
vmt	0,170	0,114	0,162	0,143	0,077	0,174	0,150	1,000							
vm7617	0,067	0,067	0,059	0,065	0,094	0,111	0,114	0,080	1,000						
ifd	0,056	0,040	0,000	0,000	0,136	0,000	0,107	0,048	0,000	1,000					
gonio	0,087	0,030	0,027	0,029	0,057	0,048	0,079	0,074	0,048	0,118	1,000				
verru	0,049	0,000	0,033	0,037	0,071	0,000	0,097	0,100	0,000	0,200	0,125	1,000			
phu	0,031	0,091	0,038	0,043	0,042	0,200	0,036	0,056	0,091	0,000	0,071	0,000	1,000		
huink	0,064	0,152	0,081	0,091	0,156	0,174	0,075	0,097	0,083	0,043	0,200	0,100	0,053	1,000	
tomate	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,059	1,000

5. Técnica R: ANÁLISIS DE LAS VARIABLES:

Análisis inverso de las matrices de similitud para determinar variables que puedan diferenciar especies, entradas, o genotipos dentro del grupo analizado.

El análisis inverso de las matrices básicas de datos (Crisci, 1983), proporciona información acerca de la asociación de variables y si las mismas poseen similitud total entre ellas. Estas asociaciones pueden ser debidas a diferentes causas. Una causa negativa es por estrecho ligamiento genético (caso de algunas bandas de RFLP), lo que indica que las variables en cuestión no cumplen con el criterio de independencia. Sin embargo, en la mayoría de los casos aquí estudiados, la causa es el agrupamiento taxonómico, es decir, un grupo de marcadores se asocian por surgimiento independiente, selección (natural o artificial), o aumento (por fenómenos de deriva génica) del conjunto de marcadores en un grupo reproductivo, sin necesidad de estar genéticamente ligados entre sí. Como esta causa es independiente del ligamiento genético, muchos de los marcadores realmente ligados, al ser sometidos a este proceso de agrupamiento, arrojan datos que tienen valor taxonómico (a pesar de esta falta de independencia en ligamiento genético). Además permite determinar cuando 2 o más bandas son diagnósticas para entidades o grupo de entidades, simplemente observando el dendrograma.

Se estudiaron dichas asociaciones en los diferentes grupos de ploidías y con los distintos métodos moleculares. Además, se estableció la probabilidad de que dichas bandas puedan utilizarse como criterio de separación taxonómica. Estos resultados se expresan en la **tabla 44**.

Tabla44: Identidad de las variables diagnósticas para los taxones estudiados.

En negro se indican los nombres de las variables diagnósticas. En negrita se indica la probabilidad de acertar al utilizar dicha variable como indicativa de ese taxón.

A: Variables diagnósticas considerando sólo los citotipos diploides. A1: Variables generadas mediante AFLP (4,2% datos perdidos); A2: Variables generadas mediante RFLP (8,6% datos perdidos) y A3: Variables generadas mediante SSR (8,5% datos perdidos)

B: Variables diagnósticas considerando sólo los citotipos tetraploides, B1: Variables generadas mediante AFLP (10% datos perdidos); B2: Variables generadas mediante RFLP (3% datos perdidos) y B3: Variables generadas mediante SSR (3,6% datos perdidos)

C: Variables diagnósticas considerando todos los citotipos. C1: Variables generadas mediante AFLP (6,6% datos perdidos); C2: Variables generadas mediante RFLP (6,8% datos perdidos) y C3: Variables generadas mediante SSR (8,5% datos perdidos).

DIPLOIDES

A 1

AFLP	Var#	%	var#	%	var#	%
<i>S. commersonii</i>	70	96	204	92	223	90
<i>S. commersonii</i>	165	86				
<i>S. kurtzianum</i>	35	100	52	96		
<i>S. megitracolobum</i>	91	96	187	86		
<i>S. spegazzinii</i>	244	100	230	100	227	96
<i>S. venturii</i>	7	100	15	100	23	100
<i>S. venturii</i>	142	98	179	86		
<i>S. vernei</i>	18	100	155	100	156	100
<i>S. vernei</i>	211	88				
<i>S.cmm (sin 7292), mga, verrucossum</i>	182	86	184	86		
<i>S.goniocalyx, S.phureja, Huinkul, Lycopersicon</i>	41	100	187	86		
<i>S.mcd (7530,4398, 7634), S. venturii</i>	213	92	197	90		
Todas las OTUs	105	100	251	100	249	100
Todas las OTUs	106	100	121	100	146	100
Todas las OTUs	250	100	157	100	206	100

A 2

RFLP

<i>Lycopersicon</i>	13	98	14	98	19	98
	20	98	22	98	24	90
<i>Lycopersicon</i>	43	84	57	90		
<i>S. chacoense 7309 1</i>	68	90	69	90		
<i>S. phureja</i>	40	98	47	98		
<i>S. venturii</i>	8	98	44	88		

A 3

SSR

<i>Huinkul</i>	137	96	66	94		
<i>S microdontum 7530</i>	48	94	104	92		
<i>S spegazzinii 6147</i>	134	96	6	78	9	78
<i>S. chacoense 4957 2, 4957 3, 4957 4</i>	74	92	14	78		
<i>S. chacoense 73091</i>	126	96	69	92	71	92
<i>S. commersonii</i>	35	94	83	92	67	90
<i>S. goniocalyx</i>	42	94	64	94		
<i>S. goniocalyx, Huinkul</i>	88	98	80	92		
<i>S. gourlayi 4837</i>	138	96	147	96	55	94
<i>S. gourlayi 4837</i>	115	92				
<i>S. kurtzianum 4946</i>	114	92	1	78	15	78
<i>S. microdontum 7493</i>	47	94	105	92		
<i>S. spegazzinii 4201</i>	94	92	2	78		
<i>S. spegazzinii 6108</i>	142	96	18	92	11	78
<i>S. tarijense 5882</i>	139	96	45	94		
<i>S. tarijense 5891</i>	151	96	30	78		
<i>S. vernei 7617</i>	131	96	51	94	52	94
<i>S. vernei 7617</i>	3	78	7	78		

TETRAPLOIDES

B 1

AFLP

<i>Huinkul</i>	24	100	82	100	83	100
<i>Huinkul</i>	100	100	143	100	143	100
<i>Lycopersicon</i>	19	100	54	100	93	100
<i>Lycopersicon</i>	109	100	116	100	130	100
<i>Lycopersicon</i>	137	100	205	94	215	88
<i>Lycopersicon y Huinkul</i>	77	100	84	100	107	100
<i>S. acaule</i>	35	100	46	100	103	100
<i>S. acaule</i>	140	100	123	88	168	81
<i>S. acaule</i>	167	81	171	81	179	81
<i>S. acaule</i>	180	81	178	81		
<i>S. acaule y Lycopersicon</i>	98	100	141	100		
<i>S. acaule 5756</i>	17	100	120	100	111	94
<i>S. gourlayii 5421, 3804</i>	3	100	36	100		
<i>S. tub ssp adg 799, 483, 796, 7507 y Huinkul</i>	119	100	172	81	185	81
<i>S. tuberosum ssp adg 483, 796, 7507 y Huinkul</i>	14	100	31	100		
<i>S. tuberosum ssp adg 483, 796, 7507, Huiinkul y Lycopersicon</i>	38	100	41	100	42	100
<i>S. tuberosum ssp adg 483, 796, 7507, Huiinkul y Lycopersicon</i>	75	100				
<i>S. tuberosum ssp andígena (799, 668, 557, 493, 662, 483, 796, 7507) y ssp. tuberosum (Huinkul)</i>	1	100	2	100	50	100
<i>S. tuberosum ssp andígena (799, 668, 557, 493, 662, 483, 796, 7507) y ssp. tuberosum (Huinkul)</i>	56	100	148	100	203	81
<i>S. tuberosum ssp andígena (799, 668, 557, 493, 662, 483, 796, 7507) y ssp. tuberosum (Huinkul)</i>	161	63	191	63	232	31
<i>S. tuberosum ssp andígena 7507</i>	11	100	40	100		
<i>S. tuberosum ssp andígena 799, Huinkul y Lycopersicon</i>	150	100	152	100		
<i>S. tuberosum y Lycopersicon</i>	183	81	228	75	176	69
<i>S. tuberosum y Lycopersicon</i>	133	100	153	81	159	81
Todas las OTUs	48	100	251	100	250	100
Todas las OTUs	157	100	249	100	146	100
Todas las OTUs	59	100	105	100	106	100
Todas las OTUs	206	100	121	100		
<i>Solanum</i>	4	100	210	63	246	44
<i>Solanum</i>	118	44	237	25		
Todas las OTUs menos <i>Lycopersicon y acl4005</i>	4	100	210	63	118	44
Todas las OTUs menos <i>Lycopersicon y acl4005</i>	246	44	237	25		
Todas las OTUs menos <i>S. Gourlayii 3804</i>	162	100	154	88	219	81
Todas las OTUs menos <i>S. Gourlayii 5421</i>	81	100	186	88	248	75
Todas las OTUs menos <i>S. Gourlayii 5421, 3804 y Lycopersicon</i>	9	100	149	100	173	75
Todos las OTUs menos <i>S. Tub ssp adg 557 y S acl 4377</i>	22	100	225	63	241	19

B 2

RFLP

<i>Lycopersicon</i>	2	100	13	100	14	94
<i>Lycopersicon</i>	20	94	22	94	24	90
<i>Lycopersicon</i>	101	100	48	100	57	94
<i>S. acaule 5756</i>	85	100	45	94	51	94
<i>S. acaule 7648</i>	40	100	100	94		
<i>S. tuberosum ssp. Andígena 483</i>	32	100	14	94	62	94
<i>Solanum tetraploides</i>	3	100	21	100	28	100
<i>Solanum tetraploides</i>	30	100	50	100	39	94

<i>Solanum tetraploides</i>	10	94	25	100	42	90
-----------------------------	----	----	----	-----	----	----

B 3

SSR

<i>Huinkul</i>	66	100	133	94	166	94
<i>S. acaule</i> 4377	39	100	32	94		
<i>S. acaule</i> 4005	94	100	96	100		
<i>S. acaule</i> 5756	59	100	156	94		
<i>S. acaule</i>	58	100	84	94	136	94
<i>S. gourlayi</i> 3804	40	100	103	100	109	100
<i>S. gourlayi</i> 3804	151	100	121	100	23	94
<i>S. gourlayi</i> 3804	31	94				
<i>S. gourlayi</i> 5421	53	100	90	100	106	100
<i>S. gourlayi</i> 5421	158	94				
<i>S. gourlayi</i> 5424, 3804	21	94	168	94		
<i>S. tuberosum</i> ssp <i>andigena</i> 493, 662, 668, 557, 483, 796, 7507 y <i>Huinkul</i>	41	100	123	100	139	94
<i>S. tuberosum</i> ssp <i>andigena</i> 662, 668	62	100	95	100	9	94
<i>S. tuberosum</i> ssp <i>andigena</i> 662, 668	11	94				
<i>S. tuberosum</i> ssp <i>andigena</i> 796, 493	101	100	18	94		
<i>S. tuberosum</i> ssp <i>andigena</i> 799 y <i>Huinkul</i>	116	100	153	94		
<i>S. tuberosum</i> ssp <i>andigena</i> 7507	77	94	139	94		

TODOS LOS CITOTIPOS

C 1

AFLP

<i>S. commersonii</i>	70	97	223	83		
<i>S. commersonii</i>	165	98	204	89		
<i>S. commersonii</i> , <i>S. megistacrolobun</i> y <i>S. verrucosum</i>	182	98	184	98		
<i>S. acaule</i>	46	97	62	97	167	97
<i>S. acaule</i>	168	97	171	98	180	98
<i>S. venturii</i>	7	100	15	100	23	100
<i>S. venturii</i>	142	98				
<i>S. venturii</i> y <i>S. microdontum</i> (7530, 4398, 7634)	197	88	213	88		
<i>S. spgazzinii</i>	230	100	244	100	227	97
<i>S. megistacrolobun</i>	91	97	187	98		
<i>S. vermei</i> 7617	18	100	155	100	156	100
<i>S. vermei</i> 7617	211	77				

C 2

RFLP

<i>S. venturii</i>	8	98	59	91		
<i>S. chacoense</i> 7309 1.	68	92	69	92		
<i>Lycopersicum</i>	13	95	57	91	14	92
<i>Lycopersicum</i>	19	89	20	89	22	92

C 3

SSR

<i>S. microdontum</i> 7530	48	95	104	94		
<i>S. microdontum</i> 7493	47	95	105	94		
<i>S. spgazzinii</i> 6147	134	95	6	84		
<i>S. chacoense</i> 4957 2, 4957 3, 4957 4	74	92	14	83		
<i>S. chacoense</i> 73091	126	96	69	92	71	92
<i>S. commersonii</i>	35	94	83	92	67	90
<i>S. gourlayi</i> 4837	138	96	147	96	55	94

<i>S. gourlayi</i> 4837	115	92				
<i>S. kurtzianum</i> 4946	114	92	1	78	15	78
<i>S. microdontum</i> 7493	47	94	105	92		
<i>S. spegazzinii</i> 4201	94	92	2	78		
<i>S. spegazzinii</i> 6108	142	96	18	92	11	78
<i>S. tarijense</i> 5882	139	96	45	94		
<i>S. tarijense</i> 5891	151	96	30	78		
<i>S. vernei</i> 7617	131	96	51	94	52	94
<i>S. vernei</i> 7617	3	78	7	78		

Las siguientes variables estuvieron únicamente presentes en las siguientes especies y fueron diagnósticas de las mismas.

Mediante AFLP se encontraron bandas diagnósticas para las especies *S. chacoense*, *S. commersonii*, *S. kurtzianum*, *S. megitracolobum*, *S. microdontum*, *S. phureja*, *S. spegazzinii*, *S. venturii*, *S. vernei* dentro del grupo de las diploides en números que van desde 1 hasta 6 bandas (tabla 44 A1). Con RFLP, solamente se hallaron bandas específicas de especie en el caso de *S. venturii* y *Lycopersicum* y bandas en entradas determinadas como *S. chacoense* 7309 1, y otros dos *S. chacoense*, 7546 (ver tabla 44A2). Finalmente, con microsatélites se pueden diferenciar las especies *S. goniocalyx*, *S. vernei*, *S. commersonii*, *S. spegazzinii*, *S. chacoense*, *S. venturii* así como individuos particulares (ver tabla 44 A3).

Para el grupo de poliploides, con AFLP se individualizaron a *S. gourlayi*, *S. oplocense*, a las dos subespecies de especies *S. tuberosum* (*ssp. andígena* (799, 668, 557, 493, 662, 483, 796, 7507) y *ssp. tuberosum* (Huinkul MAG), *S. acaule* y a todas las especies tetraploides del género *Solanum* respecto del género *Lycopersicum*. También se encontraron bandas diagnósticas para el cultivar Huinkul MAG. Además de estas bandas específicas de especie, fue posible separar individuos particulares como *S. acaule* 5756, *S. gourlayii* 5421 y al conjunto de *S. gourlayii* 5424, 3804 y a otros grupos de individuos detallados en la tabla 44B1. Los RFLP permitieron la discriminación de *S. acaule*, de las especies tetraploides del género *Solanum* respecto de tomate y de individuos particulares (tabla 44 B2). Con microsatélites, a excepción de *S. acaule*, *S. oplocense* y tomate que pudieron ser discriminadas como especies, se identificaron individuos particulares como por ejemplo, las entradas de *S. spegazzinii* 6108, 6147 y 4201; *S. vernei* 7617 etc. (tabla 44 B3).

Entre el conjunto total de citotipos, se encontraron bandas diagnósticas de especies y se detallan en la tabla diagnóstica de especies.

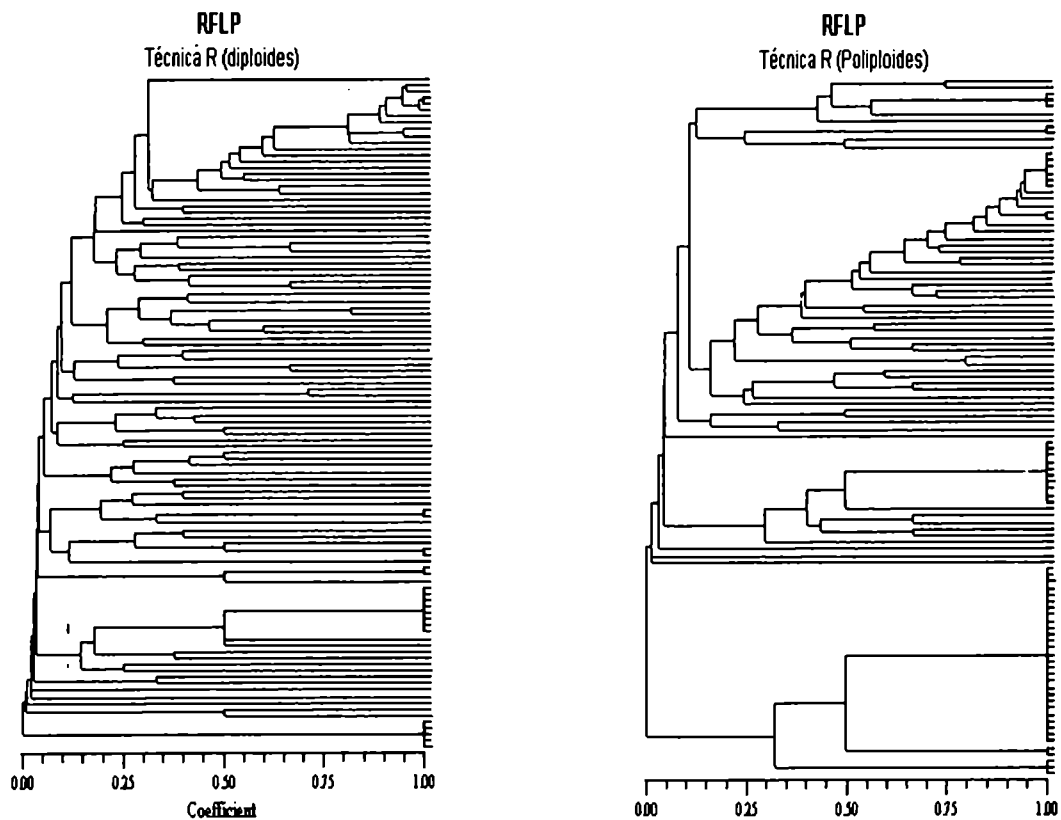
Tabla 45: Bandas diagnósticas de especies Se detalla la identidad de las variables que fueron diagnósticas para los taxones indicados, indicando, en la primera fila, dentro de qué nivel de ploidía (diploides (2x), poliploides (4x+6x)) y todos los citotipos (xx)) se localizaron y con qué tipo de marcador molecular. En la segunda columna se indica el nombre de la variable (var) diagnóstica y en negrita (%) se indica la probabilidad de acertar al utilizar dicha variable como indicativa de ese taxón dentro de los grupos de ploidías correspondientes.

AFLP 2x			RFLP 2x			SSR 2x		
Taxon	Var	%	Taxon	Var	%	Taxon	Var	%
<i>S. chacoense</i>	33	100	<i>S. chacoense</i>	72	90	<i>S. chacoense</i>	68	90
<i>S. microdontum</i>	55	96	<i>S. commersonii</i>	43	88	<i>S. infundibulliforme</i>	98	92
<i>S. phureja</i>	191	88	<i>S. goniocalyx</i>	14	88	<i>S. spegazzini</i>	46	94
<i>S. gourlayi</i>	92	92	<i>S. phureja</i>	19	98	<i>S. venturii</i>	36	90
<i>Huinkul</i>	82	98	<i>S. phureja</i>	26	96	Tomate	85	92
						<i>S. phureja</i>	63	94
AFLP 4X6X			RFLP4X6X			SSR4X6X		
<i>S. gourlayi</i>	3	100	<i>S. acaule</i>	26	95	<i>S. oplocense</i>	129	95
<i>S. oplocense</i>	169	74				Tomate	29	95
AFLP XX			RFLP XX			SSR XX		
Taxon	Var	%	Taxon	Var	%	Taxon	Var	%
<i>S. chacoense</i>	33	100	<i>S. chacoense</i>	87	90	<i>S. chacoense</i>	68	90
<i>S. microdontum</i>	55	96	<i>S. commersonii</i>	58	88	<i>S. infundibulliforme</i>	98	92
<i>S. commersonii</i>	70		<i>S. venturii</i>	8	88	<i>Huinkul</i>	66	
<i>S. commersonii</i>	223		<i>S. venturii</i>	59	98	<i>Lycopersicum</i>	29	
<i>S. microdontum</i>	55		<i>S. vernei</i>	23		<i>Lycopersicum</i>	85	92
<i>S. acaule</i>	46		<i>S. phureja</i>	26	96	<i>S. spegazzini</i>	46	94
<i>S. acaule</i>	52					<i>S. venturii</i>	36	90
<i>S. acaule</i>	167					<i>S. commersonii</i>	35	
<i>S. acaule</i>	168					<i>S. commersonii</i>	57	
<i>S. acaule</i>	171					<i>S. commersonii</i>	83	
<i>S. acaule</i>	180					<i>S. vernei</i>	3	
<i>S. venturii</i>	7					<i>S. vernei</i>	7	
<i>S. venturii</i>	15					<i>S. vernei</i>	51	
<i>S. venturii</i>	23					<i>S. vernei</i>	52	
<i>S. venturii</i>	142					<i>S. vernei</i>	131	
<i>S. kurtzianum</i>	52					<i>S. acaule</i>	58	
<i>S. megistacrolobum</i>	91					<i>S. phureja</i>	63	94
<i>S. megistacrolobum</i>	187							
<i>S. vernei</i>	18							
<i>S. vernei</i>	155							
<i>S. vernei</i>	156							
<i>S. vernei</i>	211							
<i>S. spegazzinii</i>	227							
<i>S. spegazzinii</i>	244							
<i>S. spegazzinii</i>	230							
<i>S. phureja</i>	191	88						
<i>S. gourlayi</i>	92	92						

De particular interés resulta la aplicación de los marcadores para la clasificación de las entradas de *S. venturii*, las cuales figuran como indeterminadas en el banco de germoplasma de Sturgeon Bay y como dudosas en el banco de germoplasma del INTA de Balcarce. Por lo tanto, los datos de AFLP, RFLP y SSR confirman su ubicación taxonómica. Un dato más que soporta esta confirmación, es la pérdida, en todas las entradas evaluadas, de un sitio *EcoRI* en el espaciador intergénico de todas las subunidades ribosomales del 45 S, ubicadas en el cromosoma 2.

Como se menciona en todo este apartado, los resultados se obtuvieron efectuando el análisis de agrupamiento de forma inversa, es decir viendo la asociación entre las variables según las OTUs. Como ejemplo se muestran las asociaciones de las variables obtenidas mediante RFLP.

Fig.39: Dendrogramas de las variables utilizando los datos de RFLP. Asociación de las variables utilizando el índice de Jaccard y UPGMA. (Método R de análisis). Bandas con similitud absoluta, (1) constituyen bandas diagnósticas A: bandas diagnósticas para las especies diploides y B: bandas diagnósticas para las especies tetraploides



Se observó entonces que la mayoría de las variables generadas mediante RFLP, no están relacionadas entre sí (similitud < que 0,75). Analizando las variables que tenían similitud absoluta (**Tabla 44** A2 y B2), se encontró que:

Las variables 13, 14, 19, 20, 22, 24, 43, 57 correspondientes a las sondas TG482(6) TG510(8) TG574(4) TG245(1) resultaron ser diagnósticas para tomate (considerando al grupo que incluye a todas las papas estudiadas, tanto diploides como poliploides).

Las bandas que correspondieron al ITS localizado en el cromosoma 2 fueron diagnósticas del género *Solanum* respecto de *Lycopersicum* y

La banda 8 (sonda TG479, cromosoma 3) y la 59 (sonda TG245, cromosoma 1) fueron características de todas las entradas de *S. venturii*.

Por otro lado, en este taxón se perdió un sitio de restricción *EcoRI* en el espaciador externo de los genes ribosomales respecto de todas las especies analizadas como se mencionó anteriormente.

En la **tabla 46** se detallan las variables y las sondas y cromosomas a los que pertenecen y que resultaron diagnósticas de taxones y/o genotipos.

Tabla 46: Localización de las bandas diagnósticas generadas mediante RFLP, en sus respectivos cromosomas. En la primera columna se indican los taxones, en la segunda el cromosoma donde se localizan las variables, en la tercera, el nombre de la variable, en la cuarta el nombre de la sonda de la genoteca de Cornell, en la quinta estado de la banda (propiedades) de la banda, si está presente, ausente o es única y en la sexta, el grupo citológico que permitió su detección (diploides,(2x), tetraploides (4x) y todos los citotipos (xx)).

Especie y/o individuo	Cromosoma	Variables	loci	Banda	Grupo de análisis
<i>L. esculentum</i>	6,8, 4,1	13, 14,19,20,22,2 4,43,57	TG482(6) TG510(8) TG574(4) TG245(1)	única	xx
<i>L. esculentum</i>	2	28, 30	ITS(2)	ausente	2x
<i>L. esculentum</i>	3, 8,4, 1, 11	2, 15, 27, 42,61	TG479(3) G510(8) TG574(4)TG245(1) TG393(11)	única	4x
<i>L. esculentum</i>	3,6, 4, 1, 12	3, 10, 25, 39,42, 50	TG479(3) TG482(6) TG575(4) TG245(1) TG473(12)	ausente	4x
<i>S. acaule</i> 7648	10, 2	40, 100	TG408(10) 404(9)	única	
<i>S. chacoense</i> 4810	2	29	ITS(2)	única	2x
<i>S. chacoense</i> 7309	12	68-69	TG473 (12)	única	xx
<i>S. commersonii</i> 7270	12	67	TG473(12)	única	xx
<i>L. esculentum</i>	6,8,4,1	13,14,19,20,2 2,57	TG482(6), TG510(8),TG574(4) TG245(1)	única	xx
<i>S. phureja</i>	10, 8	40,47	TG408(10) TG510(8)	única	2x
<i>S. tuberosum ssp</i> <i>andígena</i> 483	2	32	ITS(2)	única	4x
<i>S. venturii</i>	3, 1	8, 59	TG479(3) TG473(12)	única	xx

Las bandas diagnósticas de tomate se ubicaron en los cromosomas 6,8,4,1 considerando el máximo número de individuos de *Solanum*. En los otros taxones, los fragmentos discriminantes pertenecieron a uno y hasta dos cromosomas. *S. venturii*, fue la única especie que tuvo bandas diagnósticas respecto de todos los individuos, junto con *S. chacoense* 7309 y *S. commersonii* 7270.

DISCUSIÓN

El interés de los sistemáticos en proponer clasificaciones genealógicas (filogenéticas) radica en que la filogenia es la principal causa de las similitudes y diferencias entre organismos. Esto quiere decir que si dos especies cercanas comparten características similares, es más probable que esto se deba a haber heredado esas características de un ancestro común, que a dos adquisiciones independientes de características idénticas (Goboloff, 1998). El interés en el conocimiento de la genealogía, radica en que mediante él, la transmisión de la información sobre las características de los organismos clasificados podría realizarse con mayor eficacia/eficiencia. Mediante las herramientas utilizadas en este trabajo se pretende un conocimiento más acabado del grupo de especies aquí analizadas. Se describen los resultados con cada una de las tres técnicas (AFLP, RFLP y SSR) y también se aportan datos para evaluar la factibilidad de estudiar aspectos evolutivos/taxonómicos mediante el análisis de la variabilidad de los genes ribosomales.

1.EVALUACIONES FENOTÍPICAS

La información recopilada del banco de germoplasma, refleja la importancia que tienen estas colecciones así como también el interés particular que tiene, para el mejoramiento, una adecuada evaluación de los fenotipos frente a enfermedades, pestes y estreses que afectan al cultivo. De estas informaciones se infiere una interesante variabilidad en el germoplasma analizado con las siguientes características distintivas:

- Elevada variabilidad en la especie *S. chacoense*.
- Escasa producción de flores de *S. commersonii* y *S. vernei* (en las condiciones del ensayo).
- Escasa liberación de polen del grupo.
- Elevada producción de tubérculo.
- Susceptibilidad generalizada a *Pseudomonas solanacearum*.
- Existencia de plantas resistentes e inmunes a *Verticillium spp*, en *S. chacoense*, *S. commersonii*, *S. kurtzianum*, *S. megistacrolobum* y *S. oplocense*.
- La alta susceptibilidad a PLRV, con excepciones en *S. acaule*, (del Vas, tesis), *S. kurtzianum* y *S. tarijense*.

- Varios genotipos con resistencia al taladro de la hoja (*Empoasca fabae*) y a nematodos (*Meloidogyne* (hapla Nematode)).

Esta información refleja, fundamentalmente, que los evaluadores se concentraron en describir características de interés agronómico, por lo que los datos pertenecen a caracteres fuertemente influenciados por la selección natural o artificial. Estos datos no reflejan adecuadamente la variabilidad genética integral del germoplasma más que para aquellos caracteres para los que fue evaluada.

Para obtener una información más precisa se requiere de la evaluación de caracteres primariamente neutros frente a la presión selectiva como los aportados por trabajos como los de esta tesis. Se podrá argüir que esta información aporta un interés más bien teórico, de poca utilidad agronómica. Sin embargo, la probabilidad de encontrar en una muestra de germoplasma variantes para algún carácter de interés no evaluado hasta ahora estará relacionado con la variabilidad genética global del genoma la cual ayudará, además, a seleccionar un grupo representativo de genotipos para realizar análisis que no pueden realizarse sobre un gran número de muestras. Además, la combinación de ambos tipos de informaciones permitirá el diseño de cruzamientos controlados, con el fin de mapear genes de interés que aún no estén localizados. En este contexto, cabe mencionar que numerosos caracteres monogenéticos han sido ubicados en los mapas altamente saturados con marcadores, tanto en papa como en tomate (Pillen *et al.*, 1996) y a modo de ejemplo pueden citarse:

Gro1 (resistencia al patotipo Ro1 de *Globodera rostochiensis*, crom 7)

Rx1 y *Rx2* (resistencia a PVX, crom 12 y crom 5 respectivamente)

R1 (resistencia a *Phytophthora infestans*, crom 5)

R3 (resistencia a *Phytophthora infestans*, crom 11)

H1 (resistencia al patotipo Ro1 y Ro4 de *Globodera rostochiensis* próximos al locus *Rx2*, en el crom 5)

Proteína de almacenamiento (10-15 copias en el crom 8)

Color de la flor (3 loci)

Color de la piel (crom 10)

Forma del tubérculo (crom 10)

Si bien estos caracteres monogénicos revisten gran importancia, como se indicó anteriormente, la mayoría de las propiedades de interés agronómico, están controladas por numerosos genes. El estudio de los caracteres cuantitativos (QTL o Quantitative trait *loci*) mediante marcadores moleculares, permitió determinar que los mismos no estaban determinados por múltiples genes con efectos relativamente pequeños e iguales (Falconer, 1993), sino que un gran número de caracteres cuantitativos estaba determinado por varios *loci* y que los efectos de cada uno de ellos no eran iguales para todos, poseyendo unos pocos genes, efectos importantes.

Dada la gran variabilidad genética que existe en este germoplasma, constituye una fuente interesante para la búsqueda de nuevas variantes alélicas o *loci* no detectados aún, como ocurrió con los claros ejemplos de mejoramiento en tomate, utilizando el análisis de QTL en retrocruzas avanzadas (Fulton et al, 1997). Mediante la estrategia de efectuar cruzamientos con germoplasma silvestre, seguida de numerosas retrocruzas y evaluación de estos caracteres cuantitativos, fue posible por ejemplo, localizar variantes alélicas de la especie silvestre *L. Hirsutum* que incrementaron los valores de productividad, sólidos solubles y color de fruto. (D. Bernacchi en preparación). Por otro lado, se introdujeron alelos (genes) de *L. pimpinellifolium* para incrementar el tamaño del fruto, a partir de esta especie, que posee frutos muy pequeños. Aproximadamente un 50 % de los nuevos genes (alelos) hallados, fueron únicos en las especies silvestres analizadas. Un ejemplo similar puede mencionarse para arroz, que gracias a esta metodología (análisis de QTL en retrocruzas) fue posible introducir desde un antecesor silvestre de baja productividad, 2 QTL que lograron mejorar hasta un 17 % el valor de la misma. De esta manera se demuestra que el fenotipo es un predictor pobre de este potencial (Tanskley y Mc Couch, 1997).

Considerando el gran número de entradas exóticas que existen en los bancos de germoplasma y el limitado número de recursos y tiempo disponible, es necesario maximizar la chance de encontrar nuevas variantes alélicas y genes útiles para mejorar tanto la base genética de los cultivos en general, como para incrementar las posibilidades de cada uno. Por lo tanto, el análisis de variabilidad que se realiza en este trabajo, permitiría seleccionar aquellas entradas con

mayor potencial, como para encarar un mejoramiento molecular, como el anteriormente mencionado para arroz y tomate.

2.DIFERENCIACIÓN CITOLÓGICA

2.1.CARIOTIPOS

Las evaluaciones citológicas permitieron detectar los citotipos diploides ($2n=24$), los tetraploides ($2n=48$) y hexaploides ($2n=76$). En oportunidades aisladas se observaron aneuploidías, fenómeno descrito como extremadamente raro en poblaciones naturales de este género (Wilkinson, 1994).

Las mediciones de los cromosomas evidenciaron ciertas diferencias entre los genotipos evaluados. Solamente pudieron detectarse diferencias en el largo total y no en las Razones de Brazos Promedio, parámetro que fue de gran utilidad en *Festuca* y *Elymus*. Los cromosomas más largos fueron los de *S. infundibulliforme*, *S. gourlayi* y *S. tarijense* y los más pequeños los de *S. vernei*, *S. spegazinii* y *S. venturii*. Las tres primeras especies pertenecen a distintas series taxonómicas (*Cuneolata*, *Tuberosa iii* y *Yungasensa* (Hawkes, 1990)) y las últimas tres a la misma *Tuberosa iii*. Por lo tanto, el criterio de morfología de los cromosomas, no se adecuaría a la clasificación en series, al menos entre los que poseen mayor tamaño.

La comparación con los cromosomas descritos por Pijnacker y Ferwerda (1984) para *S. tuberosum ssp tuberosum*, parece indicar que las especies aquí analizadas suelen tener un número relativo mayor de cromosomas metacéntricos (con algunas excepciones), sin embargo la morfología y el tamaño del primer par cromosómico concordaron con la descrita para esa variedad de papa. También la presencia de la constricción secundaria, cuando pudo ser observada, se ubicó en el segundo par cromosómico descrito.

Contrariamente a lo esperado, la existencia de un agrupamiento ("cluster") de genes ribosomales 5S (mapeado tanto en papa como en tomate en el cromosoma 1) no estuvo acompañada de una constricción secundaria detectable en estos genotipos.

Si bien el estudio de los cariotipos no evidenció grandes diferencias dentro del grupo (como ocurriera en otros casos, como en los géneros *Oxalis*, *Festuca*, *Elymus*), se detectaron algunas variaciones de tamaño de cromosomas que pudieron ser correlacionadas positivamente con el contenido de ADN (Tabla 14 y Fig. 8).

El análisis de los cariotipos se basa en las siguientes presunciones: 1) se puede determinar la longitud exacta de los cromosomas y 2) todos los cromosomas del complemento poseen igual condensación. En rigor, ninguna de las dos condiciones se cumplen totalmente, ya que es muy difícil constatar que la contracción de los cromosomas sea la máxima, y por otro lado existen evidencias de que la morfología de los cromosomas cambia dinámicamente durante los estados de la metafase mitótica, al menos en *Hordeum* (Fukui y Kakeda, 1994), por lo tanto hay que ser cuidadoso con las conclusiones que se deriven de estos datos. No obstante, en la literatura, se considera que la utilización de agua fría como pretratamiento para lograr la contracción cromosómica, no produce efectos artificiales en la morfología de los mismos (Iijima y Fukui, 1991). Por lo tanto relativizando esos valores de longitud, como ocurre con los estimadores que son cocientes de ellas, las conclusiones serán más certeras. Sin embargo, dado el escaso tamaño de los cromosomas el error en las mediciones es elevado, contrastando con lo que ocurre en otros sistemas, donde este tipo de estudio proporcionó información altamente confiable de gran valor para la caracterización de estas entidades (como por ejemplo *Festuca* y *Oxalis*). Por lo tanto, en el caso de *Solanum*, debe recurrirse a otras herramientas más precisas.

2.2.CONTENIDO DE ADN

La utilización de la microdensitometría conlleva a la imprescindible elección de un testigo de referencia. En este caso en particular, la utilización de los eritrocitos de pollo como patrones, no resultó de utilidad. Se observó que los elevados valores de los CV de los genotipos evaluados se debieron al testigo que se utilizó. Según estos datos y los que se muestran en la **tabla 10** y **tabla 11**, no se recomienda el uso de este tejido como material de referencia. En cambio, la cebolla a pesar de poseer un elevado contenido de ADN respecto de las de las

especies analizadas, mostró un comportamiento coherente, reflejando correctamente las variaciones en los procesos de fijación y tinción de los preparados como se muestra en el valor del coeficiente de correlación de la **tabla 10**.

Los contenidos de ADN, mostraron una distribución continua entre las distintas especies. Las especies diploides que están en los extremos de distribución han sido clasificadas en la misma serie taxonómica *Tuberosa* (Hawkes, 1990). Sin embargo, ya es un hecho conocido que esta serie está formada por especies de muy diferentes orígenes, por lo que esta observación no se contrapone con su validez evolutiva sino que confirma otras evidencias de heterogeneidad taxonómica.

Si se considerara a las especies como representantes de series, podría decirse que la serie *Tuberosa* difiere en contenido de ADN de la *Megistacroloba* y *Yungasensa* y la serie *Commersoniana* de *Yungasensa* y *Tuberosa*.

Esta generalización se ve indirectamente apoyada al considerar que distintas entradas de diferentes ubicaciones geográficas mostraron igual contenido de ADN. Por ejemplo cuando se analizaron las diferencias entre dos entradas de *S. chacoense* que pertenecen a distintos lugares geográficos, como así también entre dos entradas de *S. tuberosum ssp. andígena* de diferente *habitat*, no se observaron diferencias significativas dentro de cada especie. Además, como se verá más adelante, los datos de agrupamientos derivados del análisis de AFLP, también apoyarían la existencia de estas entidades taxonómicas, por lo que el contenido genómico podría ser propuesto como criterio de clasificación.

En cambio, la comparación entre las dos subespecies de *S. tuberosum*, mostró diferencias significativas. Esto podría reflejar la diferenciación evolutiva derivada del mejoramiento efectuado por el hombre sobre el grupo de genotipos seleccionados y que dieron origen a los cultivares actuales entre los que se incluye el cultivar analizado.

Existen datos controvertidos en la literatura en referencia al contenido de ADN de la papa. Las primeras mediciones realizadas por Bennet y Smith (1976) le adjudicaron un valor de 4,2 pg, datos que resultan coherentes con las observaciones de esta tesis. Trabajos posteriores, ubican este valor de ADN en $3,6 \pm 0,08$ pg (Jacobsen *et al.*, 1983) en donde analizó distintos tejidos de un cultivar de *S. tuberosum* cv Astarte de $2n=48$. Otras estimaciones citadas en Arumuganathan y Earle (1991) ubicaron al contenido de ADN de *S. tuberosum ssp. tube-*

*rosu*m entre 3,31 y 3,86 pg. Por otro lado, la variabilidad dentro de especies también fue reportada para *Zea mays* (hasta 1,4 veces) y no así en *Sorghum bicolor* y con resultados controvertidos para *Vicia faba* (Greilhuber y Ebert, 1994).

Dada la experiencia adquirida en cuanto a las características de la coloración, las diferencias entre los tratamientos de hidrólisis, utilización de controles adecuados, en este trabajo se midieron conjuntamente con el patrón elegido y todas las muestras (los distintos genotipos) en forma conjunta. Como se trataba de numerosas muestras, las mismas se midieron en 5 oportunidades distintas, cuidando que los tiempos entre la lectura del primer preparado y el último sea el mínimo posible, de manera que el colorante no decaiga, y se incremente el error en las lecturas. Por lo tanto, las diferencias encontradas dentro de un laboratorio, son confiables, pero no necesariamente comparables entre distintos laboratorios. Las mismas pueden ser exclusivamente derivadas de la técnica, y sobre todo en los rangos de décimas de picogramos detectados.

En cuanto a otras especies diploides de papas como *S. berthaultii*, su contenido fue estimado en 1,74 pg por Arumuganathan y Earle, (1991), *S. melongena* en 2,28 y 2,48 pg (Galbraith et al, 1983 en Arumuganathan y Earle, (1991)), los cuales son datos muy cercanos a los descritos en este trabajo, que sugieren nuevamente un estrecho vínculo entre todas las especies y que fenómenos de "explosión del contenido de ADN repetitivo", no se evidenciaron en este género como mecanismo de evolución preponderante

En *Lycopersicum* (género altamente relacionado a *Solanum*), se han descrito valores de 2,0, 3,9 y 5,1 pg para el tomate común; y para especies silvestres relacionadas como *L. hirsutum*, *L. pimpinellifolium*, *L. racemiflorum* de 1,9, 1,7 y 2,0 pg respectivamente. Nuevamente los datos de las especies silvestres de este género son muy semejantes a los correspondientes a las especies de *Solanum* aquí estudiadas pero notándose gran variabilidad en las variedades mejoradas. Este fenómeno concuerda con lo evaluado en este trabajo, respecto a las diferencias entre el cv. Baraka y la subespecie *S. tuberosum ssp andigena*.

Los contenidos mencionados en *Solanum* y *Lycopersicum* están dentro del mismo rango u orden de magnitud, sugiriendo que esta característica no sufrió grandes cambios en estos dos géneros (conocidos por estar estrechamente

relacionados desde el punto de vista filogenético). Esta conservación intergenérica indica que la variación en el contenido de ADN no es un mecanismo central en la evolución y diversificación de estas especies y ayuda a explicar porqué no se observan variaciones bruscas en el contenido de ADN entre las especies estudiadas.

En cambio el género *Nicotiana* cuenta con valores estimados de contenidos de ADN más altos, como por ejemplo de 5,4 pg para los citotipos diploides ($2n=24$) de *N. othopora*, de 4,8 pg para *N. paniculata* y de 10 y 12,5 pg para *N. tabacum* (4x). También el género *Capsicum*, tanto en las especies cultivadas como silvestres, mostró un contenido de ADN mayor que *Solanum* (de 8 a 12,9 pg para formas diploides de $2n=24$). Ambos géneros (*Nicotiana* y *Capsicum*) están filogenéticamente más alejados de *Solanum* que *Lycopersicum*. Mientras *Solanum* y *Lycopersicum* tienen mapas genéticos casi idénticos (los mapas comparativos entre ambos sólo se diferencian en 5 inversiones paracéntricas, Tanskley *et al.*, 1996); en *Capsicum*, se observaron grandes rearrreglos de los cromosomas respecto de *Lycopersicum* y *Solanum*, y basándose en la homología de los clones utilizados, se observó que apenas un 31 % del genoma está conservado entre estos géneros (Pillen *et al.*, 1996),

Para estudiar las variaciones en el contenido genómico que acompañaron el fenómeno de poliploidización se estudiaron las relaciones por genoma haploide de los diferentes citotipos de las mismas especies. Cabe mencionar, que se detectó un individuo tetraploide de *S. venturii* entre las muestras analizadas. Si bien, *S. venturii*, no posee otros citotipos (Hawkes, 1990), hay que destacar la gran capacidad de formación de gametas no reducidas característica de este grupo de especies. No obstante deberían analizarse más individuos para descartar un posible error.

Los valores de contenido genómico en los citotipos poliploides no arrojaron múltiplos exactos de los valores genómicos haploides. El hecho que los contenidos de ADN por genoma haploide difieran (tanto por aumento como por disminución) de los valores de las especies diploides no resulta novedoso. Se observaron ya situaciones similares en el género *Triticum* o *Brassica* (donde se detectaron disminuciones en las especies poliploides con respecto a las diploides). Mayores disminuciones se hallaron en especies con altas ploidías como *Tradescantia* (Martínez y Ginzo, 1985), *Bulnesia* (Poggio y Hunziker, 1986),

etc. En cambio en algodones alotetraploides, las diferencias fueron muy pequeñas.

Actualmente existen listas de contenidos de ADN de más de 1000 especies angiospermas (Bennet *et al.*, 1982, Arumuganathan *et al.*, 1991) que ofrecen la posibilidad de analizar la variabilidad entre las distintas especies. Existen géneros que, para el mismo nivel de ploidía, no presentan o es muy escasa la variación en su contenido de ADN, como son los casos de *Hordeum*, *Avena* que son monocotiledóneas. El género aquí estudiado (*Solanum*) sería un ejemplo para dicotiledóneas a contrapunto de otros géneros de dicotiledóneas como *Lathyrus*, *Heliantus*, *Vicia* y *Crepis* que presentan variaciones de hasta 9 veces.

3.CONSTRICCIONES SECUNDARIAS Y GENES RIBOSOMALES

Los estudios de taxonomía y evolución utilizando a estos genes, se llevaron a cabo en numerosos *taxa*. Específicamente en *Solanum* se concentraron en la especie *S. tuberosum* y (Borisjuck *et al.*, 1993,1994, Hemleben *et al.*, Harding D. (1991), Gruber (1991)). Las enzimas que cortan en un único sitio dentro de la unidad de repetición en tándem, proporcionaron información acerca de la variabilidad de los tamaños, atribuidos usualmente a cambios en el número de subrepeticiones en el espaciador externo. Esto se comprobó aquí principalmente en Southernns con la enzima *BglII*, que en el género *Solanum* mostró poseer un sitio adicional respecto a *Lycopersicum* ubicado, justamente, en el espaciador externo. Los tamaños estimados para la unidad de repetición fueron de 8,6 kpb a 10,5 kpb según la especie y siendo más amplio este rango que el descrito por Borisjuck (Borisjuck *et al.*, 1993) de 8,7 kpb a 9,3 kpb. Sin embargo, en electroforesis usando concentraciones y calidades de geles de agarosa que incrementan la resolución, (mediante la enzima *EcoRV*) se encontraron, para ciertas entradas de las especies *S. kurtzianum*, *S. spgazzini*, *S.tuberosum ssp tuberosum*, *S. tuberosum ssp andigena* y *S. chacoense* la coexistencia de varias bandas (entre 2 y 4). Con la misma enzima, también se detectó la presencia de al menos dos tipos de subunidades en algunos de estos casos. Las intensidades de radiactividad asociadas a estas bandas supernumerarias y sus tamaños relativos respecto a la banda principal fueron varia-

bles indicando heterogeneidad en la composición de las unidades de repetición en los agrupamientos o clusters. Por muy sorprendente que sea esta falta de homogenización de las secuencias, la misma ya fue descrita para varias especies incluyendo *Solanum* (Borisjuk et al, 1993,1994). Se descarta la presencia de otros agrupamientos de estos genes fuera del cromosoma 2 porque no fueron evidenciados en los análisis de segregación usando los genes ribosomales como sondas de RFLP (Gebhardt et al, 1991, Bonierbale et al, 1988).

En el caso de *BglII*, esta heterogeneidad de secuencias dentro de cada organismo se puede atribuir a por lo menos dos causas:

1) La pérdida de algún sitio de restricción de algunas de las subunidades dentro del espaciador intergénico ya sea por mutación o, más probablemente, como consecuencia de metilación. *BglII* tiene citosina en el sitio de corte, 5'AGATCT3', y su actividad se ve inhibida por metilación de ese residuo. A menos que el fenómeno de metilación sea consecuencia directa de la secuencia, no se trataría de variación de la presencia del sitio, sino inhibición del mismo. Un fenómeno que se ha explicado en la literatura y que favorecería la metilación de C, es la presencia de CG a continuación de los motivos reconocibles por las enzimas. Este mismo evento se menciona para el caso de *EcoRI*. Estas unidades carentes del sitio *BglII* adicional se asemejarían a la situación de tomate donde existe un único sitio para esta enzima, pero resulta difícil hipotetizar si esta variante minoritaria es un relicto evolutivo previo a la separación de ambos géneros o una convergencia evolutiva.

2) La delección (o duplicación) de las subunidades de repetición del espaciador intergénico o, más probablemente, la presencia de subunidades de distintas composiciones nucleotídicas y tamaños (ya que la suma de los fragmentos generados por *BglII* (para una entrada determinada) no siempre concuerda con el tamaño de la subunidad completa (que no tiene sitio de restricción en el espaciador)). Dichas diferencias oscilaron desde 0,1 a 0,7 kpb, dentro de cada entrada.

La región responsable de este comportamiento variable pudo ser localizada en el extremo 5' del espaciador gracias a las hibridaciones diferenciales con la sonda codificante para el rRNA de 28S y los resultados de digestión con la enzima *BglII* recién, mencionada y *DraI*. Esta otra enzima (*DraI*) permitió confir-

mar la variabilidad de la porción 5' del espaciador externo. La misma posee al menos 3 sitios dentro de la subunidad.

A pesar de lo dicho, con la excepción de las especies mencionadas (*S. cha-coense*, *S. kurtzianum*, *S. spegazzini*, *S. tuberosum ssp tuberosum*, *S. tuberosum ssp andigena*), el resto mostró un solo tamaño de subunidad.

Dentro de los polimorfismos de sitios de restricción, una enzima que mostró variabilidad en los sitios de corte, fue *EcoRI*. La misma posee varios sitios de corte dentro de la subunidad repetitiva y se detectaron variaciones en el sitio presente en el extremo 3' del espaciador externo. En cambio se observó una alta conservación de dichos sitios en las porciones codificantes. En todas las entradas de la especie *S. venturii* se comprobó la pérdida de un sitio en la región mencionada (extremo 3' del espaciador, próximo al 17S).

El sitio *EcoRI* de del extremo 5' del 25S, evidenció estar ausente o inactivado por metilación en todas las entradas, pero solo en algunas subunidades (entre un 33% y 50%). Sin embargo hubo 2 entradas, *S. commersonii* (Oka 7313) y *S. megistacrolobum* (Oka 4430) que perdieron el sitio en todas las subunidades repetitivas. La posibilidad de que el sitio estuviera afectado por metilación es muy alta ya que datos de secuenciación en tomate, (Kiss et al, 1989) mostraron que este sitio GAATTC está seguido por CG y que propiciaría la metilación.

En todas las entradas de *S. venturii* y en *S. microdontum* (7530) se observó, además, que existían fragmentos de aproximadamente 5 kpb que no hibridaban con el 25S y que estaban ausentes en las demás especies, salvo algunas de ellas, pero con señal muy débil (los mismos fragmentos se han descrito para *L. pennellii*, (Vallejos et al 1988)). Al hibridar con IGS, se comprobó que los fragmentos de 5 kpb contienen al espaciador externo, además se corroboró que la banda de 3,8 kpb que hibrida con el 25S no involucra al espaciador. Sin embargo si los fragmentos del 25S (de 2,56 y 2,73 kpb) que se forman de manera alternativa por la posible metilación, dejan su contraparte en el espaciador también con 0,1 kpb alternativos, esto debería hibridar con el espaciador externo y se detectarían bandas que explicarían la presencia de fragmentos con 0,1 kpb de diferencia, produciendo, al menos, bandas más anchas. El hecho de no detectar estos fragmentos, se contrapone a la hipótesis de Borisjuk (1994), que propone la existencia de los dos sitios posiblemente metilados del 3' del 25S. En cambio, la ausencia de estos fragmentos 0,1 kb podrían sugerir la

existencia de dos tipos de subunidades con tamaños que difieren en 0,1kb, en lugar de la metilación (ver Fig. 22).

Sorpresivamente, fragmentos de idéntico tamaño pero que esta vez hibridaron con el 25S se observaron en varias de las entradas de *S. tuberosum ssp andigena*, *S. acaule* y en *S. tuberosum ssp. tuberosum* sugiriendo nuevas modificaciones en el IGS.

4.MARCADORES MOLECULARES

Es conocido que las distintas técnicas moleculares empleadas en esta tesis detectan variaciones causadas por mecanismos diferentes que seguramente no tienen la misma tasa de mutación (evolución). Existen evidencias propias y de la literatura de que las bandas amplificadas mediante AFLP al ser utilizadas como sondas hibridan (en Southern blots) con secuencias repetitivas y por lo tanto no codificantes (Martínez, 1997; Marcucci Poltri, 1996). Por lo tanto, el hecho de suponer que casi todos sitios están involucrados en regiones no codificantes es bastante correcto.

Los RFLP detectan fundamentalmente rearrreglos (pequeñas deleciones, inserciones, inversiones) sobre todo cuando se usan enzimas de restricción que reconocen 6 bases (y no 4, por ejemplo),(no en el caso de los genes ribosomales) y las regiones afectadas son fundamentalmente no codificantes (intrones y secuencias intergénicas) pero más relacionadas con los genes (si las sondas fuesen de cDNA). Como los AFLP detectan, fundamentalmente, mutaciones de punto; las velocidades no tienen porqué coincidir (se tratan de tipos de mutaciones distintas). Incluso en los AFLP no es lo mismo la aparición de A y T, que de G y C porque debido al fenómeno de metilación de citosinas tiende a haber más transversiones CG a AT que alrevés.

La velocidad de mutación de los marcadores de tipo SSR, está gobernada por otro mecanismo distinto a los otros 2 (recombinación desigual y deslizamiento de la DNA polimerasa). Además, las presiones de selección de cada uno de los microsatélites evaluados, puede ser variable, ya que algunos, se obtienen a partir de secuencias publicadas, que corresponden a regiones genómicas presentes en los genes aunque rara vez sean codificantes.

La evaluación de todo el genoma mediante marcadores moleculares se desarrolló empleando tres tecnologías.

Los RFLP, utilizando 15 sondas que mapean al menos en cada uno de los 12 cromosomas. Los datos obtenidos con los genes ribosomales, como puede deducirse de la sección anterior, resultan bastante complejos para estudios de variabilidad genética en este género, y no obstante la gran información generada, se está analizando únicamente una porción limitada del genoma localizada en el cromosoma 2, por lo tanto no se consideraron en el análisis de agrupamiento. Para no generar información redundante, y dado que estudios llevados a cabo en el laboratorio, con 3 genotipos de papas diploides, evidenciaron la existencia de polimorfismos con varias enzimas para una misma sonda, (evidenciando rearrreglos en los cromosomas), sólo una combinación sonda-enzima fue considerada para los posteriores análisis mediante RFLP con sondas representativas de todo el genoma.

Los AFLP mostraron un alto número de variables de posición desconocida. Si bien no puede asegurarse la distribución homogénea por todo el genoma y menos la cobertura total del mismo, el reciente catálogo de marcadores publicado por Roupe *et al.* (1998), conteniendo la distribución de marcadores en el genoma con sus respectivas posiciones en el mapa sugiere que, si bien hay un agrupamiento con localización preferencial de algunos de ellos en determinados cromosomas, se observó al menos un *locus* representativo de cada grupo de ligamiento para cada combinación de oligonucleótidos ensayada. La alta capacidad de multiplex de los AFLP permitió que se evaluaran aproximadamente 250 *loci* con tan sólo 4 combinaciones de oligonucleótidos.

Los microsatélites utilizados, hasta el momento no han sido mapeados, y en consecuencia se desconoce su ubicación cromosómica. Si bien el número de combinaciones de oligonucleótidos específicos evaluados es de 7, se observó que al menos uno (SO10) evidentemente es *multi locus* para muchas de las entradas analizadas, aunque no se sabe a cuántos *loci* totales involucra. Esto fue así aún en *S. phureja*, *S. tuberosum ssp. andigena*, especies más emparentadas con *S. tuberosum ssp. tuberosum* especie en el que el microsatélite fue aislado y caracterizado

En el caso de los otros microsatélites evaluados, sólo esporádicamente se observó mayor número de bandas que las esperables de un solo *locus* (**tabla 26**). Esto podría explicarse considerando que los microsatélites fueron desarrollados a partir de un cultivar de papa y que los *loci* supernumerarios presentes en el genoma de las especies silvestres se perdieron durante la domesticación de la papa

Una observación interesante es el bajo número relativo de alelos diferentes observado en las OTUs hexaploides (*S. oplocense*) respecto del resto de las entradas poliploides evaluadas. Esto se podría explicar por poca antigüedad evolutiva de la especie (como ocurre en el trigo hexaploide), por una alta tasa de fijación de alelos (esta especie es autógama con un alto porcentaje de multiplicación vehiculizada por semillas botánicas), o bien presentan alelos nulos no detectados en los cromosomas homeólogos que podrían indicar mayor divergencia entre los genomas que le dieron origen.

Las especies tetraploides (también autógamas), en cambio, presentaron un alto grado de heterocigosis en los cromosomas homeólogos.

Los índices de contenido polimórfico de AFLP y RFLP no mostraron diferencias significativas entre ellos, y tampoco cuando se compararon los diploides vs. los poliploides (**Tabla 37**), esto último a pesar de la diferencia entre el número de genotipos analizados en cada grupo (1200 cromosomas en los 50 genotipos diploides vs 936 cromosomas en los 16 genotipos poliploides). Esto podría esperarse si se consideran genomas de 24 cromosomas alopoliploides, totalizando 40 "unidades diploides de genoma".

Los valores de los índices de contenido polimórfico de AFLP fueron comparables a los reportados recientemente en papa cultivada (Milbourne *et al.*, 1997) y en especies de soja (Powell *et al.*, 1996) pero superiores a los encontrados en 100 variedades de soja argentina (Giancola, 1998). No obstante, fueron menores que el índice detectado en una población de mejoramiento formada por 40 clones de *Eucalyptus dunnii* (originario de una limitada región de Australia (Marcucci Poltri *et al.*, 1998 datos no publicados) a pesar de tratarse de una única especie, evidenciando la reducida variabilidad existente en el grupo estudiado en esta tesis, para las mutaciones puntuales. Cabe mencionar que el

valor máximo de PIC que puede obtenerse cuando hay únicamente dos alelos, es de 0,5 y dicho valor se alcanza únicamente cuando el 50% de los individuos presentan la banda.

En el caso de los microsatélites evaluados, el valor de los índices promedio que corresponde a las OTUs diploides fue similar al observado en papa cultivada y algo mayor que el mencionado para dos especies de soja y entre variedades de soja (Powell et al, 1996; Giancola 1998)

Esta escasa variabilidad, comparable a la encontrada en una especie conocida por su estrecha base genética como es la soja, puede explicarse, parcialmente, a la influencia relativa de los datos provenientes de la evaluación del microsatélite SO26 de papa, que mostró un índice de 0,04 (disminuyendo el promedio en forma considerable).

Los coeficientes de similitud promedio dentro de especies fueron comparables en los dos niveles de ploidía y con los tres marcadores utilizados. Los valores más altos de similitud se obtuvieron con AFLP, luego siguieron los generados por RFLP y por último los obtenidos mediante SSR. (Fig. simil dentro)

4.1.ALELOS COMUNES ENTRE EL GERMOPLASMA Y LA PAPA CULTIVADA

Los genotipos diploides y poliploides compartieron 2/3 de los alelos, tanto de AFLP como RFLP; y solamente 1/3 de los alelos generados por microsatélites. Ese resultado era previsible, considerando la elevada tasa de mutación a la que están sometidas estas últimas secuencias. También hay que destacar que dentro del grupo se observó la presencia de alelos nulos, que podrían indicar disimilitud en las regiones colindantes a los motivos de repeticiones, o ausencia de los *loci*, por rearreglos genómicos.

Al comparar los alelos presentes en los genotipos diploides y en el cultivar de papa estudiado, claramente se visualizaron menos alelos comunes de RFLP y SSR, respecto de los generados mediante AFLP. Esto podría indicar el tipo de

variabilidad que cada marcador es capaz de detectar, ya que los RFLP detectan rearrreglos (inserciones, deleciones, translocaciones); los microsatélites, cambios en el número de repeticiones y los AFLP fundamentalmente, mutaciones puntuales, y en fragmentos pequeños menores de 500 bases. Esto sugiere que las diferencias entre los citotipos diploides y poliploides, son de menor envergadura que las diferencias entre el cultivar de papa y los genotipos tanto diploides como poliploides..

4.2.CORRESPONDENCIA ENTRE LOS SISTEMAS:

Las correlaciones entre los distintos métodos de evaluación utilizados se midieron mediante el coeficiente de correlación entre las matrices de similitud. Si bien todos dieron significativos, los que mostraron valores mayores fueron los de AFLP y SSR (mayores a 0,6 para todos los grupos evaluados) **Tabla 39**. No obstante todos correlacionaron de manera similar y por lo tanto se agruparon a todos los datos y se analizaron los dendrogramas con el total de la información (526 variables, 273 *loci*). La topología de los árboles generados de esta forma, no mostró diferencias con los individuales.

En este caso, en donde se utilizan datos que provienen de distintos segmentos genómicos que probablemente no posean la misma velocidad de mutación, no sería del todo correcto la utilización de UPGMA como algoritmo para establecer las relaciones entre los taxones.

Con estos datos puede observarse el agrupamiento de las entradas de una misma especie, ocurre con mayor similitud que entre especies.

4.3.TOPOLOGÍA DE LOS DENDROGRAMAS

El reloj molecular plantea una tasa de evolución (tasa de mutación) constante en el tiempo. Asumiendo marcadores ubicados en regiones no codificantes, esta hipótesis debería ser cierta, porque no hay una presión de selección que los lentifique (como es el caso de las secuencias conservadas ribosomales o genes que codifiquen para propiedades morfológicas, sujetas a distintas presiones de selección). Bajo este supuesto, la aplicación del UPGMA para la construcción de los árboles es correcta. Sin embargo, al utilizar datos que pro-

vienen de sistemas que detectan variaciones que probablemente no posean la misma *velocidad* de mutación, se plantea una posible limitación a la utilización de UPGMA como algoritmo para establecer las relaciones entre los taxones.

4.3.1.APLICACIÓN DEL MÉTODO DE UPGMA

En términos generales, todos los genotipos de una misma especie se agruparon con similitudes mayores que con las demás especies.

La posición de *Lycopersicon esculentum*, como grupo externo fue correspondida con las tres tecnologías.

Utilizando UPGMA, *S. commersonii* formó un agrupamiento que la unió al resto de los taxones con menor similitud, tanto para AFLP como RFLP. Con SSR, las ramas del árbol resultaron muy próximas y no podría afirmarse con certeza que la similitud sea la más baja con el resto de los taxones. *S. commersonii* está considerada como la especie menos evolucionada del grupo, según Hawkes (1990) y Hawkes y Jackson (1992).por lo tanto, los AFLP y RFLP estarían apoyando a dicha hipótesis. *S. goniocalyx* y *S. phureja*, también se agruparon con ambas metodologías, no así con SSR.

El cultivar Huinkul, mostró distintas posiciones según la técnica evaluada, siendo la más coherente con los datos de origen de los cultivares la que la posiciona junto con *S. phureja* y *S. goniocalyx*, ambas especies cultivadas y que aportaron parte de su genoma en programas de introgresión de caracteres en la papa común (*S. tuberosum*) después de cruzamientos amplios. Esta situación se registró con los AFLP.

La posición de *Lycopersicon*, fue claramente la de un grupo externo (outgroup) con las tres tecnologías. En cuanto a la clasificación en series, sólo se respetó dicho orden en el dendrograma de AFLP, agrupándose con mayor similitud las entradas de *S. chacoense* y *S. tarjense*, actualmente incluidas dentro de la serie *Yungasensa* Mediante RFLP, ambas especies aparecieron intercaladas, como se puede observar en al **fig. 33 A**.

En el grupo de tetraploides al igual que en diploides, los genotipos de las mismas especies se agruparon con mayor similitud entre ellas con las tres tecnologías. *S. acaule* reflejó mayor similitud dentro, que *S. gourlayi*, a pesar de que

esta última especie estuvo representada por sólo dos entradas, y perteneciendo a distintas ubicaciones geográficas. El grupo externo (tomate), se comportó como tal, en los fenogramas de AFLP y RFLP. no así en SSR. En este punto hay que destacar, que en las condiciones de apareamiento ("annealing") de los oligonucleótidos, casi no se observaron amplificaciones indicando alta especificidad de secuencia.

Los clones de *S. tuberosum ssp andigena*, se ordenaron de diferente manera y no mostraron asociación alguna con otras entradas pertenecientes a la región de colección. Asimismo, sus asociaciones con Huinkul no respetaron a un genotipo determinado.

Toda esta información, está gobernada por el número de *loci* que se evaluó con cada herramienta y tiene distinto peso, al considerar las comparaciones entre ellas. Obviamente, los 250 *loci* analizados con AFLP, a pesar de ser una tecnología de visualización dominante, superan ampliamente la cobertura genómica respecto de los 14 *loci* de RFLP y de los 7 microsatélites evaluados, a pesar de que el número de variables fue de 80 para RFLP y de 160 para SSR.

4.3.2. APLICACIÓN DEL MÉTODO DE NEIGHBOR-JOINING

Cuando se construyó el árbol empleando el algoritmo de Neighbor Joining a partir de las matrices de distancias generadas mediante el complementario del índice de Jaccard, las especies *S. chacoense* y *S. tarijense*, ambas consideradas dentro de la serie taxonómica *Yungasensa*, fueron agrupadas (árboles con datos de AFLP, RFLP Y SSR, **fig. 35**). El mismo efecto se había observado utilizando UPGMA y con los mismos marcadores. Esto refleja la base evolutiva que sustenta al menos en esta sección de la clasificación

En el caso de *S. commersonii*, que pertenece a la serie *Commersoniana*, la hipótesis evolutiva de su clasificación la ubica dentro de las más primitivas del grupo. Ésta, fue ubicada como más distante del resto de las especies, en los árboles construidos a partir de AFLP y RFLP como se mencionó anteriormente; y en el caso particular de la utilización de NJ, también mostró mayor divergencia del grupo pero solamente en el caso de RFLP (datos no mostrados).

CONCLUSIONES

CARIOTIPOS Y CONTENIDO DE ADN

- Si bien el estudio de los cariotipos no evidenció diferencias conspicuas, se detectaron variaciones de tamaño de cromosomas que pudieron ser correlacionadas con el contenido de ADN.
- El contenido de ADN de las especies diploides varió desde 1,963 hasta 2,307 pg; en las tetraploides de 3,605 hasta 4,740 pg y en la especie hexaploide fue de 6,213 pg.
- En el proceso de poliploidización no se conservaron los contenidos originales de ADN de los genomas haploides.
- El número de organizadores nucleolares (NORS) aumentó proporcionalmente a la ploidía, indicando que en este grupo taxonómico no se produjo el fenómeno de inactivación de los mismos.

VARIABILIDAD DE LOS GENES RIBOSOMALES

- Polimorfismos de longitud
 - Los tamaños de las unidades de repetición pudieron ser estimados con las enzimas *Xba*I, *Eco*RV y *Bgl*II (c/u con uno o dos sitios en cada subunidad) y fueron de alrededor de 9 kb (similarmemente a tomate y a lo descrito en otras especies del género).
 - Se registró variabilidad intraespecífica en estos tamaños en todas las especies analizadas y se demostró que esta variabilidad está fundamentalmente localizada en la porción 5' del espaciador intergénico.
 - En algunos casos el grado de variabilidad fue tan grande que se la encontró entre individuos pertenecientes a la misma entrada como fue el caso de *S. chacoense*.
 - Fué posible detectar heterogeneidad evidenciada por la existencia de por lo menos dos tipos de subunidades en algunos taxones con *Xba*I y otras enzimas.
 - En contraste, se registró un alto grado de conservación relativa en *S. commersonii*.

- Polimorfismos de restricción:
 - Se detectaron polimorfismos para la porción 5' del IGS y el sitio *DraI*, ubicado en esa región estuvo ausente en algunas subunidades de todas las entradas de *S. tarijense*, a excepción de (Oka 5633); *S. gourlayi* (Oka 5421 y Oka 7680); todos los clones de *S. tuberosum* ssp *andigena* y Huinkul MAG (a excepción del clon 483), *S. goniocalyx*, *S. verrucosum* y *S. phureja*.
 - El sitio *EcoRI* mostró variabilidad de dos tipos: ausencia en el IGS y metilación diferencial en la región 5' del 25S. Lo notable para el resto de los sitios *EcoRI* fue su conservación (corroborándose la existencia de los dos sitios *EcoRI* en la porción 3' de la subunidad 25S) salvo en *S. venturii* donde se perdió el sitio *EcoRI* del espaciador cercano a la unidad 17S en todas las subunidades que pudieran integrarla.

VARIABILIDAD DEL GENOMA

- Se utilizaron AFLP, RFLP y SSR para evaluar la variabilidad existente abarcando 272 *loci* genómicos diferentes.
- Con las tres técnicas los genotipos pertenecientes a una misma especie se agruparon con mayor similitud entre sí, que con los de otras especies y el grupo de control externo (*Lycopersicon*), se comportó como tal (mostrando menor similitud con el resto del grupo).
- En cambio hubo discrepancias en los agrupamientos generados por los distintos tipos de marcadores tanto respecto a la taxonomía clásica como entre sí.
- La mejor concordancia con la taxonomía clásica se logró mediante AFLP resultando ser los marcadores que mejor describen las distancias interespecíficas en los distintos grupos de ploidía e intergenéricas con respecto a *Lycopersicon*. Los microsatélites resultaron más discriminativos para distancias genéticas estrechas (intraespecíficas o interespecíficas si las especies están muy relacionadas).
- Los índices de similitud entre los genotipos fueron comparables entre AFLP y RFLP y menores que los de SSR.

- El número de alelos diferenciales entre el cultivar Huinkul MAG y los citotipos diploides fue mayor que respecto de los poliploides.
- Basándose en estos datos se podría proponer como criterio para la conservación de germoplasma el mantenimiento de distintos números de genotipos totales según las especies, conservando mayor número de aquellas entradas pertenecientes a especies que ofrezcan mayor número de alelos distintos (novedosos).
 - El promedio de los índices de diversidad o índices de contenido polimórfico entre los citotipos diploides y poliploides calculados con las distintas técnicas, no difirió significativamente salvo para los microsatélites.
 - Los índices de similitud calculados con los tres sistemas utilizados resultaron positiva y significativamente correlacionados, con valores promedios de coeficientes de correlación de 0,57 para diploides y 0,73 para poliploides, obteniendo los valores más altos las correlaciones entre AFLP y SSR independientemente del nivel de ploidía.
 - Las especies con mayor homogeneidad (índices de similitud más próximos y menores varianzas) fueron *S. acaule* y *S. venturii* mientras que *S. chacoense* y *S. gourlayi* fueron las especies más heterogéneas.
 - Cuando se compararon los agrupamientos obtenidos se concluyó que los resultados de AFLP evidenciaron en general, coherencia con la taxonomía establecida.
 - *S. chacoense* y *S. tarijense* (ambas pertenecen a la serie taxonómica *Yungasensa*) mostraron mayor acercamiento entre sí con AFLP y SSR. Con RFLP, se intercalaron las entradas de ambas especies, indicando mayor acercamiento genético aún.
 - *S. phureja* y *S. goniocalyx* se unieron con papa comercial.
 - Las entradas de *S. microdontum ssp. microdontum* se agruparon más próximamente entre sí y luego con las otras dos subespecies, *malmeanum* y *giganotphyllum* utilizando los datos de RFLP. Mediante SSR solamente se acercaron dos entradas de *S. microdontum ssp. microdontum*

entre sí y mediante AFLP, se agruparon pero sin respetar la cercanía taxonómica.

- Las dos subespecies de *Solanum tuberosum*, se vincularon más estrechamente entre sí, que con el resto.

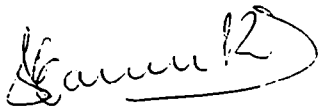
ASOCIACION DE VARIABLES

- Se individualizaron variables exclusivas de *Solanum* y *Lycopersicum*.
- Pudieron detectarse variables diagnósticas para casi todas las especies, y se calcularon las probabilidades de ser utilizadas exitosamente como tales.
- Se localizaron bandas específicas de determinados genotipos fundamentalmente mediante SSR.


EVOLUCION DE LAS ESPECIES USANDO EL ALGORITMO DE "NEIGHBOR JOINING" Y DATOS MOLECULARES DE AFLP, RFLP Y SSR

- Se aplicaron ambos algoritmos de ligamiento (UPGMA y NJ) para estimar el árbol filogenético, los cuales confirmaron algunos agrupamientos mencionados:
 - A nivel de series, *S. chacoense* y *S. tarijense*
 - A nivel de subespecies las dos subespecies de *S. microdontum* y las dos de *S. tuberosum*
 - A nivel de especies, todas las especies y con ambos métodos de ligamiento.
- A nivel de entrada: individuos de una misma entrada, como *S. chacoense* 4957 y 2955, 4810 (con ambos métodos) y clones de *S. tuberosum ssp. andigena*
- A nivel de localización geográfica: *S. venturii* 7618 y 7619; *S. acaule* 5756 y 4005. *S. tarijense* 5882 y 5889; *S. acaule* 5756 y 4005, *S. tuberosum ssp andigena* 668 y 662.

- *S. commersonii* no mostró mayor divergencia con el resto de las especies. (rechazando la hipótesis de Hawkes de considerar a esta especie más primitiva)
- El agrupamiento de *S. chacoense* y *S. tarijense* se mantuvo (aceptando la hipótesis de clasificación en Series de Hawkes).
- Los genotipos *S. phureja*, *S. gooniocalyx* y Huinkul MAG se agruparon.
- *S. commersonii*, mostró distinta ubicación según el algoritmo utilizado (con UPGMA, fue el grupo más divergente y con NJ, se intercaló con el resto de los taxones).
- *S. gourlayi* y *S. tuberosum* constituyeron un clado que difirió de *S. acaule*. mediante NJ, en cambio mediante UPGMA, *S. gourlayi* se alejó del resto.
- Las discrepancias entre ambos métodos, pueden deberse a que la ultrametricidad supuesta para la utilización de UPGMA, no se cumple al utilizar todos los datos de manera conjunta, debido a las distintas velocidades de evolución de los fragmentos involucrados.



Susana Marcucci Poltri



Dr Horacio Esteban Hopp

REFERENCIAS

- Arumuganathan K y Earle ED. (1991). Nuclear DNA content of some important plant species. *Plant Mol. Biol. Rep.* 9(3): 208-218.
- Brown Wt; Zhong N; Dobkin C. (1996). Positive fragile x microsatellite associations point to a common mechanism of dynamic mutation evolution. *Amer Jour Of Human Genet.* 58(3):641-643.
- Baird E, Cooper-Bland S, R. Waugh, De Maine M y W. Powell. Molecular characterisation of inter-specific and intra-specific somatic hybrids of potato using randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. (1992). *Mol Gen Genet* 233: 469-475.
- Bamberg, JB, MW Martin, JJ Schartner y DM Spooner, 1996. Inventory of tuber bearing *Solanum* species. Potato Introduction Station, NRSP-6, Sturgeon Bay, WI <http://www.ars-grin.gov>
- Beckmann, J., y Soller, M. (1990). Toward a unified approach to genetic mapping of eukariotes based on sequence tagged microsatellite sites. *BioTechnology* (8), 930-932.
- Bennett MD y Smith JB (1976). Nuclear DNA amounts in angiosperms. In *Philosophical transactions of the royal society of London.* 274: 227-274.
- Bennett MD, Smith JB y Helslop-Harrison JS.(1982). Nuclear DNA amounts in angiosperms. *Proc. R. Soc. Lond B* 216: 179-199.
- Bonierbale M, R L Plaisted y S D Tanksley (1988). RFLP maps of potato and tomato based on a common set of clones reveal modes of chromosomal evolution. *Genetics* 112: 887-898.
- Borisjuk N y Hemleben V. (1993). Nucleotide sequence of the potato rDNA intergenic spacer. *Plant Mol Biol* 21: 381-384.
- Borisjuk N, Borisjuk L, Petjuch G y V Hemleben. (1994). Comparison of nuclear ribosomal RNA genes among *Solanum* species and other Solanaceae. *Genome* 37: 271-279.
- Bretting, P., y Widrechner (1995). Genetic markers and horticultural germplasm management. *HortScience*, 30(7), 1349-1356

- Bretting, P., y Widrechner (1995). Genetic markers and horticultural germplasm management. *HortScience*, 30(7), 1349-1356.
- Chase C D, Ortega V M. y C E Vallejos. (1991). DNA restriction fragment length polymorphisms correlate with isozyme diversity in *Phaseolus vulgaris* L. *Theor. Appl. Genet.* 81:806-811.
- Clausen A M y J. Crisci. (1989). Análisis multivariado de la variación morfológica de poblaciones diploides y tetraploides de *Solanum gourlayi* (Solanaceae), y especies relacionadas. *Darwiniana* 29 (1-4): 247-259.
- Crisci JV y López Armengol MF. (1983). Introducción a la teoría y práctica de la Taxonomía Numérica. OEA.
- Crowhurst R N, Lints R, Atkinson R G, y R C Gardner. (1990). Restriction fragment length polymorphisms in the genus *Actinidia* (Actinidiaceae). *Pl. Syst. Evol.* 172:193-203.
- D'Arcy WG. 1972. Solanaceae studies. II Typification and subdivisions of *Solanum*. *Ann. Missouri Bot Garden* 59: 262-278.
- De Azkue D y Martínez A (1990). Chromosome number of the *Oxalis tuberosa* alliance (*Oxalidaceae*). *Pl. Syst. Evol.* 169, 25-29.
- De Verna y Alpert, 1990.
- Debener T, F. Salamini y Gebhardt C. (1991). The Use of RFLPs Detects Germoplasm Introgressions from Wild Species into Potato. (*Solanum tuberosum* ssp. *tuberosum*) Breeding Lines. *Plant Breeding* 106, 173-181.
- Debener T, Salamini F, Gebhardt C. (1990). Phylogeny of wild and cultivated *Solanum* species based on nuclear restriction fragment length polymorphisms (RFLPs). *Theor. Appl. Genet* 79: 360-368.
- Del Rio, AH; Bamberg, JB; Huaman, Z. (1997). Assessing changes in the genetic diversity of potato gene banks .1. Effects of seed increase. *Theoretical And Applied Genetics* 95 (1-2):191-198. Article
- Demeke T; Lynch Dr; Kawchuk Lm; Kozub Gc; Armstrong Jd. (1996). Genetic Diversity Of Potato Determined By Random Amplified Polymorphic Dna Analysis. *Plant Cell Reports*, 15(9):662-667

- Deverna Jw; Rick Cm; Chetelat Rt; Lanini Bj; Alpert Kb. Sexual hybridization of lycopersicon-esculentum and solanum-rickii by means of a sesquidiploid bridging hybrid. (1990). PNAS (USA), 87(23): 9486-9490
- Dudley JW. (1994). Comparison of genetic distance estimators using molecular marker data. Proceedings of the Symposium Analysis Of Molecular Marker Data.
- FAO (1991). Potato production and consumption in developing countries. Plant production and protection paper. 110.
- Fatokun C A, Danesh D, Young N D, y E L Stewart.(1993). Molecular taxonomic relationships in the genus *Vigna* based on RFLP analysis. Theor. Appl. Genet. 86:97-104.
- Feingold S, 1998. Tesis doctoral.
- Fu, Y., Pizzuti, A., Fenwick, R., King, J. J., Rajnarayan, S., Dunne, P., Dibel, J., Nasser, G., Ashizawa, T., de Jong, P., Wieringa, B., Korneluk, R., Perryman, M., Epstein, H., y Caskey, C. (1992). Un unstable triplet repeat in a gene related to miotonic muscular dystrophy. Science(255), 1256-1258.
- Fukui K, Kakeda K (1994), A critical assesment of karyotype analysis by imaging methods. Jpn. J. Genet. 69: 537-544.
- Fulton et al, 1997. Citado en Tanskley y Mc.Couch, 1997.
- Ganal MW, Bonierbale MW, Roeder MS et al. (1991). Genetic and physical mapping of the patatin genes in potato and tomato. Mol. Gen. Genet 225:501-509.
- Gebhardt C, E Ritter, A Barone, T Debener, B Walkemer, U Schachtschabel, H Kaufman, R D Thompson, M W Bonierbale, M W Ganal, S D Tanskley y F Salamini (1991). RFLP maps of potato and their alignment with the homoeologous tomato genome. Theor. Appl. Genet. 83: 49-57.
- Gepts, P. (1990). citado en Bretting y Widrlechner, 1995.
- Gerlach, WL y Bedbrook, JR. (1979). Cloning and characterization of the genes for ribosomal RNA genes from wheat and barley. Nucleic Acids Res. 7: 1869-1885.

- Giancola S. Tesis doctoral UBA (1998) Caracterización y diferenciación de germoplasma de soja (*Glycine max.* (L) Merr.) mediante marcadores moleculares
- Goboloff Pablo (1998). Principios básicos de cladística. Sociedad Argentina de Botánica. Facultad de Agronomía de la Universidad de Buenos Aires.
- Greilhuber J y I Ebert (1994). Genome size variation in *Pisum sativum*. *Genome*, 37: 646-655.
- Gruber Véronique (1991). Heterozygosity in tetraploid potatoes revealed by rDNA polymorphism analysis of their dihaploid progenies: a contribution to chromosome assignment. *Plant Mol Biol* 17: 1045-1054.
- Gruenbaun Y Naveh-Many T, Cedar H and Razin A. (1981). Sequence specificity of methylation in higher plant DNA. *Nature*, 292: 860-862.
- Grun Paul (1990). The evolution of cultivated potatoes. *Economic Botany*, 44 (3supplement), 39-55.
- Hadrys H; Schierwater B; Dellaporta SI; Desalle R; Buss Lw. (1993). Determination of paternity in dragonflies by random amplified polymorphic dna fingerprinting. *Molecular ecology*, 2(2):79-87.
- Harding D. (1991). Molecular stability of the ribosomal RNA genes in *Solanum tuberosa* plants recovered from slow grow and cryopreservation. *Euphytica* 55: 141-146.
- Hawkes JG. (1979). Evolution and polyploidy in potato species. In *The biology and taxonomy of the Solanaceae*. Eds. by JG Hawkes, RN Lester and ADSkelding. Linnean Society Symposium Series N7 pp. 637-645.
- Hawkes, J.G. y Herting J.P., (1969). *The potatoes of Argentina, Brazil, Paraguay and Uruguay*. Oxford: Clarendon Press.
- Hawkes, J.G. 1990. *The Potato Evolution, Biodiversity and Genetics Resources*. Belhaven Press. London.
- Haymer, D. (1994). Random amplified polymorphic DNAs and microsatellites: What are they, and can they tell us anything we don't already know? *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 87(6), 717-722.

- Hillis DM y Dixon MT. (1991). Ribosomal DNA: Molecular evolution and phylogenetic inference. *The quarterly review of biology*. vol6, 4: 411-439.
- Hoisington, D. Khairallah, M. y González de León, D. 1994. *Laboratory Protocols: CIMMYT Applied Molecular Genetics Laboratory*. Second Edition. Mexico, D.F. CIMMYT.
- Hosaka K. (1986). Who is the mother of the potato ?- restriction endonuclease analysis of chloroplast DNA of cultivated potatoes. *Theor. Appl. Genet* 72: 606-618.
- Hosaka K. y D.M. Spooner (1992). RFLP analysis of the wild potato species, *Solanum acaule* Bitter (*Solanum* sect. *Petota*). *Theor. Appl. Genet.* 84: 851-858.
- Howard HW y Swaminathan MS. (1952). Species differentiation in the genus *Solanum* Sect *Tuberosum* with a particular reference to the use of interspecific hybridization in breeding. *Euphytica* 1: 20-28.
- Hunziker AT (1979). South American Solanaceae: a synoptic survey. In
- Iijima K. y Fukui K. (1991). Clarification of the conditions for the image analysis of plant chromosomes. *Bull. Natl. Inst. Agrobiol. Resour.* 6: 1-58.
- Ishii T, Terachi T, Mori N y Tsunewaki K. (1993). Comparative study on the chloroplast, mitochondrial and nuclear genome differentiation in two cultivated rice species, *Oryza sativa* and *O. glaberrima*, by RFLP analyses. *Theor. Appl. Genet.* 86:88-96.
- Jacobs Jme; Vaneck Hj; Arens P; Verkerkbakker B; Hekkert Btl; Bastiaanssen Hjm; Elkhartbotly A; Pereira Jacobsen E; Stiekema Wj. (1995) A Genetic Map Of Potato (*Solanum Tuberosum*) Integrating Molecular Markers, Including Transposons, And Classical Markers. *Theoretical And Applied Genetics*, 91(2):289-300.
- Jacobsen E, Tempelaar M J y E W Bymolt. (1983). Ploidy level in leaf callus and regenerated plants of *S. tuberosum* determined by cytophotometric measurements of protoplasts. *Theor. Appl. Genet.* 65: 113-118.

- Jeffreys, A., Wilson, V., y Thein, S. (1985). Hypervariable "minisatellite" regions in human DNA. *Nature*(314), 67-73.
- Kim, JH; Joung, H; Kim, HY; Lim, YP (1998). Estimation of genetic variation and relationship in potato (*Solanum tuberosum* L.) cultivars using AFLP markers. *American Journal Of Potato Research*, 75(2):107-112.
- Kremer, E., Pritchard, M., Lynch, M., Yu, S., Holman, K., Baker, E., Waren, S., Schlessinger, D., Shuterland, G., y Richards, R. (1991). Mapping of DNA instability at the fragile X to a trinucleotide repeat sequence p(CCG)n. *Science*(252), 1711-1714.
- Levan, A., Fredge, K y Samberg, AA. (1964). Nomenclature for centromeric position of chromosomes. *Hereditas* 52: 201-220.
- Lijavetzky DC. (1996) Tesis doctoral UBA. Mapeo y caracterización de marcadores moleculares asociados al brotado precosecha en sorgo granífero.
- Litt, M., y Luty, J. (1989). citado en Haymer, 1994
- Lynch M; Milligan Bg.(1994). Analysis of population genetic structure with rapid markers. *Molecular Ecology*. 3(2):91-99
- Magoon 1958
- Manifeto et al, 1998. En preparación.
- Marcucci Poltri S et al. 1996. Utilización de "Bulked segregant analysis" y AFLPs no radiactivos en la detección de marcadores moleculares ligados a un nuevo gen de vernalización en *Triticum monococcum*. Taller de Biotecnología vegetal. Noviembre. FIBA. PROPIOP-REDBIO. Mar del Plata
- Markert, C., y Moller, F. (1959). Multiple forms of enzymes: tissue, ontogenetic, and species specific patterns. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*(45), 753-763.
- Martínez A y H D Ginzo. (1985). DNA content in *Tradescantia*. *Can. J. Genet. Cytol.* 27: 766-775.
- Maughan Pj; Maroof Mas; Buss Gr; Huestis Gm. (1996). Amplified fragment length polymorphism (AFLP) in soybean - species diversity, inheritance, and near-isogenic line analysis. *Theor Appl Genet* 93(3):392-401.

- Maughan, P., Saghai Maroof, M., Buss, G., y Huestis, G. (1996). Amplified fragment length polymorphism (AFLP) in soybean: species diversity, inheritance, and near isogenic line analysis. *Theoretical and Applied Genetics*(93), 392-401.
- McMillin, D., Allan, R., y Roberts, D. (1986). Association of an isozyme locus and strawbreaker foot rot disease derived from *Aegilops ventricosa* in wheat. *Theoretical and Applied Genetics*(72), 743-747.
- Meksem K; Leister D; Peleman J; Zabeau M; Salamini F; Gebhardt C. (1995) A High-Resolution Map Of The Vicinity Of The R1 Locus On Chromosome V Of Potato Based On Rflp And Aflp Markers. *Molecular & General Genetics*, V249(N1):74-81.
- Milbourne D, Meyer R. C., Collins A. J, Ramsay L. D. , Gebhardt C., Waugh R. (1998). Isolation, characterisation and mapping of simple sequence repeat loci in potato. *MGG259* (3): 233-245.
- Milbourne D, Rhonda Meyer, John E Bradshaw, Eileen Baird, Nicky Bonar, Jim Provan, Wayne Powell y Robbie Waugh. (1997). Comparison of PCR-based marker systems for the analysis of genetic relationships in cultivated potato. *Molecular Breeding* 3: 127-136.
- Miller, J.C. y Tanksley, S.D.1990. RFLP analysis of phylogenetic relationships and genetic variation in the genus *Lycopersicon*.*Theor. Appl. Genet* 80:437-448.
- Miller, J.C. y Tanksley, S.D.1990. RFLP analysis of phylogenetic relationships and genetic variation in the genus *Lycopersicon*.*Theor. Appl. Genet* 80:437-448.
- Mitchell Mc Grath y Carlos F. Quiros. 1992. Genetic diversity at isozyme and RFLP loci in *Brassica campestris* as related to crop type and geographical origin. *Theor. Appl. Genet.* 83: 783-790.
- Mohan Madan, Suresh Nair, A Bhagwat, TG Krishna, Masahiro Yano, CR Bhatia y Tajuki Sasaki. (1997). Genome mapping, molecular markers and marker assisted selection in crop plants. *Molecular Breeding* 3: 87-103.

- Mok DWS, Heiyoung KL y Peloquin SJ. (1974). Identification of potato chromosomes with Giemsa. *American Potato Journal* 51, 337-341.
- Morgante, M., y Olivieri, A. (1993). PCR-amplified microsatellites as markers in plant breeding. *The Plant Journal*, 3(1), 175-182.
- Ohno (1972). citado por Haymer, 1994.
- Okada, K A y Clausen. (1982). Natural hybridization between *S. acaule* Bitter and *S. megistacrolobum* Bitter in the Province of Jujuy, Argentina. *Euphytica* 31:817-835.
- Pardue, M., y Gall, J. (1970). Chromosomal location of mouse satellite DNA. *Science (Washington DC)*(168), 1356-1358.
- Parsons BJ, Newbury HJ, Jackson MT y Ford Lloyd B. (1997). Contrasting genetic diversity relationships are revealed in rice (*Oriza sativa*) using different marker tyypes. *Molecular Breeding* 3 : 115-125.
- Paterson, A., Tanskley, S., y Sorrells, M. (1991). DNA markers in plant improvement. *Advances in Agronomy*(46), 39-90.
- Pijnacker LP y Ferwerda MA (1984). Giemsa C-banding of potato chromosomes, *Canadian Journal of Genetics and Cytology* 26, 415-419.
- Pijnacker LP, Hermelink JHM y Ferwerda MA (1986). Variability of DNA content and karyotype in cell cultures of an interdihaploid *Solanum tuberosum*. *Plant Cell Reports* 5: 43-46.
- Poggio L y Hunziker JH (1986). Nuclear DNA content in *Bulnesia*. *J. Hered.* 77: 43-48.
- Powell W, Morgante M, Andre C, Hanafey M, Vogel J, Tingey S, Rafalski A (1996). The utility of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Mol Breed* 2: 225-238.
- Provan J, Powell W, R. Waugh. (1996). Microsatellite analysis of relationships within cultivated potato (*Solanum tuberosum*). *Theor Appl Genet* 92: 1078-1084.

- Provan J; Powell W; Waugh R. Analysis Of Cultivated Potato (*Solanum Tuberosum*) Using Intermicrosatellite Amplification. *Genome*, Aug, 1996, V39(N4):767-769.
- Raina SN, Parida A, Koul KK, Salimath SS, Bisht MS y VRaja (1994). Associated chromosomal DNA changes in polyploids. *Genome*, 37: 560-564.
- Ramana MS y M Wagenvoort. (1976). Identification of the trisomic series in dipliod *Solanum tuberosum* L, group tuberosum. Chromosome identification. *Euphytica*, 25: 233-240.
- Rash, E M, Barr, H J , Rash R W (1971). The DNA content of sperm of *Drosophila melanogaster*. *Chromosoma (Berl)* 33, 1-18.
- Recursos Genéticos . <http://www.inta.gov.ar/prognac/pan07.htm>
- Ross, H.(1896). Potato Breeding: Problems and Perspectives. *Plant Breeding N** 37. Parey, Berlin, Hamburg.
- S. Paul, F. N. Wachira, W. Powell, R. Waugh. (1997) Diversity and genetic differentiation among populations of Indian and Kenyan tea (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) revealed by AFLP markers. *Theor. Appl. Genet* 94:2, 255-263
- Saitou N. y Nei M. (1987). The neighbor Joining method: a new method for reconstructing phylogenetics trees. *Mol. Biol. Evol.* 4: 406-425.
- Sax, K. (1923). The associations of size differences with seed coat patterns and pigmentation -citado en Paterson et al., 1991-. *Genetics*(8), 552-560.
- Schneider, JHM; Salazar, O; Rubio, V; Keijer, J.(1997). Identification of *Rhizoctonia solani* associated with field-grown tulips using ITS rDNA Polymorphism And Pectic Zymograms. *European Journal Of Plant Pathology*, 103(N7):607-622.
- Simpson, S. (1989). Detection of linkage between quantitative traits and restriction fragment length polymorphisms using inbred lines. *Theoretical and Applied Genetics*(77), 815-819.
- Sokal RR y Sneath PH. (1963). Principles of numerical taxonomy. Freeman, San francisco

- Spooner DM, Tivang J, Nienhuis J, Miller JT, Douchas DS, Contreras MA. (1996). Comparison of four molecular markers in measuring relationships among the wild potato relatives *Solanum* section *Etuberosum* (subgenus *Potatoe*). *Theor Appl Genet* 92: 532-540.
- Spooner, DM; Castillo, R. Reexamination of series relationships of South American wild potatoes (Solanaceae: *Solanum* sect *Petota*): Evidence from chloroplast DNA restriction site variation. *American Journal Of Botany*, May, 1997, 84(N5):671-685.
- Tanskley SD y Mc Couch S. (1997). Seed Banks and Molecular Maps: Unlocking genetic potential from the wild. *Science* 227: 1063-1066.
- Tanskley, S. (1983). Molecular markers in plant breeding. *Plant Molecular Biology Reporter*(1), 3-8.
- Tanskley, S., Medina-Filho, H., y Rick, C. (1982). Use of naturally occurring enzyme variation to detect and map genes controlling quantitative traits in an interspecific backcross of tomato. *Heredity*(49), 11-25.
- Tanskley, S., Young, N., Paterson, A., y Bonierbale, M. (1989). RFLP mapping in plant breeding: New tools for an old science. *BioTechnology*(7), 257-264.
- Tautz, D. (1989). Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acid Research*(17), 6463-6471.
- Tempelaar M J. 1980. DNA content in isolated nuclei of postembryonic stages of progeny from normal and irradiated males of *Tetranychus urticae* Koch. (Acari, Tetranychidae). *Chromosoma (Berl)* 77, 359-371.
- Thormann CE, Ferreira ME, Camargo LEA, Tivang JC, Osborn TC. (1994) Comparison of RFLP and RAPD markers to estimating genetic relationships within and among cruciferous species. *Theor. Appl. Genet.* 88 :973-980..
- Valkonen JPT, Watanabe KN, y E. Pehu (1994). Analysis of correlation between nuclear DNA content, chromosome number, and flower capacity of asymmetric somatic hybrids of diploid *S. brevidens* and (di)haploid *S. tuberosa*. *Jpn. J. Genet* (1994). 69:525-536)

- Vallejos CE, Tanksley SD y R Bernatzky (1986). Localization in the genome of DNA Restriction Fragments containing sequences homologous to the rRNA (45S), the major chlorophyll *a/b* binding polypeptide and the ribulose biphosphate carboxylase genes. *Genetics* 112: 93-105.
- van de Ven W T G, Duncan N, Ramsay G, Phillips M, Powell W y R Waugh. (1993). Taxonomic relationships between *V. faba* and its relatives based on nuclear and mitochondrial RFLPs and PCR analysis. (1993). *Theor. Appl. Genet.* 86:71-80.
- vanderVoort, JNAM; vanEck, HJ; Draaistra, J; vanZandvoort, PM; Jacobsen, E; Bakker, J (1998). An online catalogue of AFLP markers covering the potato genome. *Molecular Breeding*, , V4(N1):73-77.
- vanderVoort, JR; Wolters, P; Folkertsma, R; Hutten, R; vanZandvoort, P; Vinke, H; Kanyuka, K; Bendahmane, A; Jacobsen, E; Janssen, R; Bakker, J.(1997) Mapping of the cyst nematode resistance locus *Gpa2* in potato using a strategy based on comigrating AFLP markers. *Theor Appl Genet*, 95(5-6):874-880.
- Vaneck HJ; Vandervoort Jr; Draaistra J; Vanzandvoort P; Vanenckevort E; Segers B; Peleman J; Jacobsen E; Helder J; Bakker J. The Inheritance And Chromosomal Localization Of Aflp Markers In A Non-Inbred Potato Offspring *Molecular Breeding*, 1995, V1(N4):397-410.
- Vigliola (1986). Manual de Horticultura. Buenos Aires- Argentina,
- Visser RGF, Hoekstra R, Van der Leij FR, Pijnacker LP, Witholt B, Feenstra WJ (1988): *In situ* hybridization to somatic metaphase chromosomes of potato. *Theor Appl Genet* 76: 420-424.
- Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, van der Lee T, Hornes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M, Zabeau M (1995). AFLP: a new technique for DNA fingerprinting, *Nucleic Acid Res.* 23: 4407-4414.
- Waugh R, Baird E y W. Powell. (1992). The use of RAPD markers for the detection of gene introgression in potato. *Plant Cell Reports* 11:446-469.
- Weeden, N., y Wendel, J. (1989). citado en Bretting y Widrechner, 1995. .

- Welsh J; Mcclelland M.(1990). Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. NAR.18(24): 7213-7218.
- White TJ, Bruns T, Lee S and Taylor. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. PCR Protocols: A guide to Methods and Applications. Academic Press. P:315
- Wilkinson MJ. (1994). Genome evolution in potatoes p 43-66. In Potato Genetics. Eds. JE Bradshaw y GR Mac Kay. CAB International.
- Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalsky, J.A., Tingey, S. V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Res. 18:6331-6335
- Yeh BP y SJ Peloquin. (1965). Pachytene chromosomes of the potato (*Solanum tuberosum*, group andigena). Am. J. Bot. 52: 1014-1020.
- Zabeau M, Vos P (1993) Selective restriction fragment amplification: a general method for DNA fingerprinting. European Patent Application, publication no.: EP 0534858-A1, No. 92402629.7