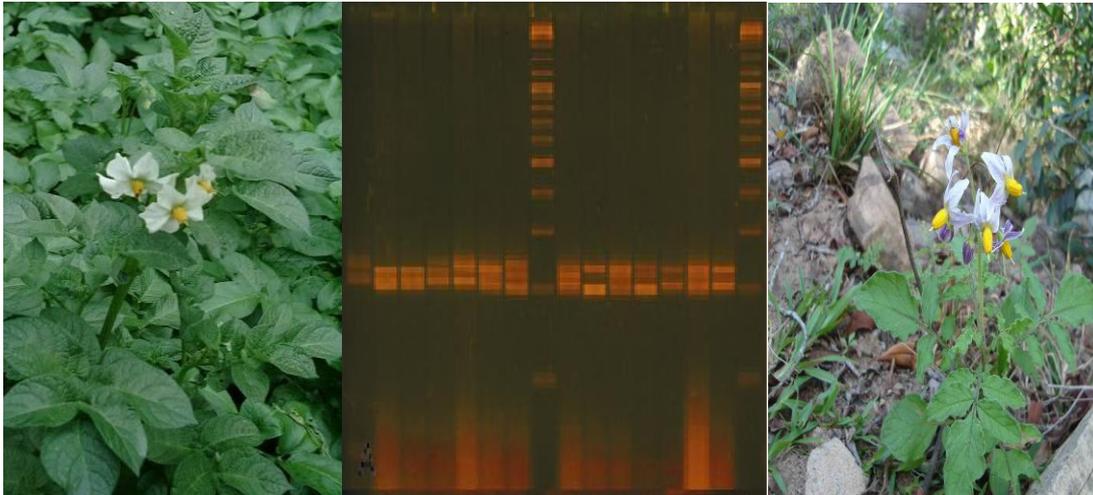


**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA  
FACULTAD DE CIENCIAS**

**Análisis Genético de la introgresión de germoplasma de *Solanum  
Commersonii* en papa**



**por**

**Mario Alejandro GIAMBIASI RODRÍGUEZ**

**TESIS presentada como uno de los  
requisitos para obtener el título de  
*LICENCIADO EN BIOQUÍMICA***

---

## ***PÁGINA DE APROBACIÓN***

Tesis aprobada por:

---

Nombre completo

---

Nombre completo

Fecha: -----  
-

Autor: -----  
Mario Alejandro GIAMBIASI RODRÍGUEZ

Tutor: -----  
-  
Pablo SPERANZA

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a:

Mi tutor Dr. Pablo Speranza, por haber confiado en mí y brindarme la oportunidad de trabajar en su equipo, por su buena disposición y por la gran cantidad de tiempo y esfuerzo dedicado en mi formación

Mis compañeros de trabajo, en especial Alejandro Vaco y Daniela Muzzo, por su valiosa colaboración, y por los buenos momentos compartidos.

A Msc. Paola Gaiero por sus valiosos comentarios sobre el manuscrito de este trabajo.

A mi familia, por el apoyo brindado durante todos estos años. Agradezco también a Valentina, por todo su amor y por iluminar mi camino.

A mis compañeros de estudio, por los momentos compartidos durante el transcurso de la carrera.

## TABLA DE CONTENIDOS

PÁGINA DE APROBACIÓN .....	II
AGRADECIMIENTOS .....	III
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
IMPORTANCIA DEL CULTIVO DE PAPA EN URUGUAY Y EL MUNDO Y ALGUNAS LIMITANTES. .	1
EL CULTIVO DE PAPA.....	2
UTILIZACIÓN DE ESPECIES EMPARENTADAS CON <i>S. TUBEROSUM</i> EN MEJORAMIENTO .....	3
<i>Hibridación interespecífica.....</i>	<i>4</i>
<i>Número de Balance del Endosperma (EBN).....</i>	<i>5</i>
<i>Gametos 2n .....</i>	<i>6</i>
IMPORTANCIA DE <i>S. COMMERSONII</i> COMO RECURSO GENÉTICO EN URUGUAY .....	7
ESQUEMA DE INTROGRESIÓN PROPUESTO .....	10
RETROCRUZA ASISTIDA POR MARCADORES .....	12
<i>Marcadores genéticos utilizados en el mejoramiento .....</i>	<i>13</i>
<i>Microsatélites .....</i>	<i>15</i>
OBJETIVOS.....	18
<i>Objetivo General:.....</i>	<i>18</i>
<i>Objetivos específicos:.....</i>	<i>18</i>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>19</b>
EXTRACCIÓN DE ADN.....	19
ELECCIÓN DE LOCI DE SSR A UTILIZAR .....	19
AMPLIFICACIÓN Y DETECCIÓN DE LOS MARCADORES MOLECULARES .....	21
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>23</b>
MATERIALES PARENTALES .....	23
TRIPLOIDES.....	24
PENTAPLOIDES.....	26
RETROCRUZAS.....	29
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>35</b>
INTROGRESIÓN DE CROMATINA DE <i>S.COMMERSONII</i> EN EL GERMOPLASMA DE PAPA.....	35
CONSTITUCIÓN GENÉTICA Y FORMACIÓN DE LOS TRIPLOIDES.....	35
<i>Modo de producción de los gametos no reducidos.....</i>	<i>35</i>
<i>Cromosomas de <i>phu</i> en los triploides .....</i>	<i>36</i>
CONSTITUCIÓN GENÉTICA DE LOS PENTAPLOIDES.....	36
CONSTITUCIÓN GENÉTICA DE LOS HÍBRIDOS DE LA RETROCRUZA.....	37
<i>Mecanismo de apareamiento cromosómico en los híbridos .....</i>	<i>37</i>
<i>Contribución genética de <i>phu</i> en la retrocruga .....</i>	<i>38</i>

<i>Selección asistida por marcadores</i> .....	38
<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>39</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>40</b>
<b>APÉNDICE</b> .....	<b>45</b>

# Introducción

## ***Importancia del cultivo de papa en Uruguay y el mundo y algunas limitantes.***

La papa (*Solanum tuberosum*) es el cuarto cultivo alimenticio más importante del mundo, después del maíz, trigo y arroz, con una producción a nivel mundial en el año 2007 de 325,3 millones de toneladas y un valor estimado de la cosecha de 40 mil millones de dólares. Se espera que para 2020 la demanda de la papa sea el doble de la consumida en 1993 (FAO 2009). Esta hortaliza provee la mayor fuente de nutrición e ingreso para muchas sociedades (Spooner y Hettterscheid 2005). Además es el cultivo hortícola más importante en Uruguay, donde se producen 140.000 Tn anuales, que tienen un valor de comercialización superior al resto de los rubros hortícolas, de más de 50 millones de dólares. El consumo en Uruguay es superior a 40 kg/habitante/año (INIA 2008).

Los cultivares de papa son afectados por diferentes patógenos. Uno de los que produce mayores pérdidas es una bacteria llamada *Ralstonia solanacearum*. Ésta se instala en el xilema de la planta causando la obstrucción del pasaje de flúidos, provocando el marchitamiento y muerte de la planta. Esta enfermedad es causa de crecientes pérdidas en todo el mundo, evolucionando desde climas tropicales hacia climas templados (Janse 2004). En Uruguay se ha observado una incidencia importante de la marchitez bacteriana. Esto se atribuye a la inexistencia de tratamientos curativos efectivos y a la ocurrencia de condiciones ambientales muy propicias para el desarrollo de esta enfermedad (Galván 2006).

La marchitez bacteriana se ve agravada por la ausencia de cultivares de papa con resistencia estable. Hoy en día, sólo es posible hallar escasos ejemplos de cultivares con resistencia parcial, entre los que se encuentran, Achatt (de origen alemán), Molinera (CIP, Perú) y Cruza-148. Las fuentes de resistencia para estos materiales provienen de cultivares antiguos y especies silvestres, siendo *S. phureja* la fuente más usada. (French y De Lindo, 1982). La base genética de su resistencia radica en pocos genes de herencia simple y aditivos. La resistencia es específica para determinadas cepas de la raza 1 y 3 y se muestra sensible a temperaturas elevadas (entre 30 y 35°C). Por otro lado, se ha visto en algunos casos resistencia de herencia compleja y poligénica en híbridos de *S. tuberosum* (French y De Lindo, 1982). En Uruguay, el marchitamiento bacteriano en papa es producido exclusivamente por la Raza 3 (biovar 2A) del patógeno (Francisco Vilaró, com. pers.). La incidencia de la bacteria normalmente se sitúa en el 10% del área plantada, aunque en años donde las condiciones ambientales son favorables ha alcanzado el 34% (MGAP-DIEA 2002).

El cultivo de papa también es sensible a diferentes tipos de hongos, virus, y condiciones climáticas adversas, como la sequía y el frío. Una de las estrategias para superar estas limitantes es la incorporación de resistencia a estos factores bióticos y abióticos a partir de especies emparentadas. Es por esto que la incorporación de germoplasma de *S. commersonii*, una especie emparentada a la papa, nativa de la región, constituye una estrategia potencialmente muy promisorio para incrementar la adaptación a las condiciones locales. Para ello INIA lleva adelante un programa de mejoramiento donde se hicieron cruzamientos entre la especie nativa y ejemplares de papa, con el fin de introgresar germoplasma de *S. commersonii* a los cultivares de papa (González 2010).

El objetivo general de este trabajo es monitorear la introgresión de cromatina de *S. commersonii* en el germoplasma de papa en el programa de cruzamientos interespecíficos que lleva adelante INIA.

### ***El cultivo de papa***

La papa es un miembro de la familia Solanaceae, que incluye varias especies económicamente importantes, tales como tomate, berenjena, petunia, tabaco y ají. Es una planta herbácea anual que alcanza un metro de altura. Sus hojas compuestas producen almidón, el cual se desplaza hacia la parte final de los tallos subterráneos donde se da un engrosamiento, dando lugar a tubérculos. Los tubérculos funcionan como depósito de nutrientes que permiten a la planta subsistir durante la estación fría y posteriormente reverdecer y reproducirse. Cada uno de ellos tiene de 2 hasta 10 brotes laterales, de los que brotan las nuevas plantas cuando las condiciones vuelven a ser favorables (FAO 2009).

*Solanum tuberosum* (tbr) es una planta autotetraploide  $2n=4x=48$ , teniendo cuatro juegos monoploides de cromosomas o genomios homólogos (Huaman y Spooner 2002). Se reproduce en forma sexual o asexual. Para el primer tipo de reproducción, se requiere la producción de flores con órganos reproductivos femeninos (*pistilos*) y masculinos (*anteras*). Gracias a estas estructuras se da la unión del material genético de los progenitores, que da origen a plantas con nuevas combinaciones de genes. De esta forma, las plantas generadas por reproducción sexual, se desarrollan a partir de semillas. Por otra parte, en la reproducción asexual o vegetativa, la nueva planta surge a partir de los tubérculos y, como no hay recombinación de material genético, posee la misma constitución genética que el individuo que le dio origen. Esta forma de reproducción, da lugar a descendientes genéticamente idénticos a la planta progenitora, es decir, un clon (Camadro 1996).

Las variedades cultivadas de *S. tuberosum* se dividen en dos subespecies ligeramente distintas: *andígena*, adaptada a condiciones climáticas de día corto, cultivado mayoritariamente en los Andes, y *tuberosum*, que es la papa que en el presente se cultiva en la mayor parte del mundo, adaptada a días largos y comúnmente denominada papa “europea”.

Se piensa que el grupo *tuberosum* procede de cultivares andinos que fueron introducidos en el siglo XIX, a Europa (FAO 2008).

### **Utilización de especies emparentadas con *S. tuberosum* en mejoramiento**

La papa cultivada (*Solanum tuberosum* ssp. *tuberosum*) está emparentada con más de doscientas especies silvestres. Todas éstas especies tienen un número básico de cromosomas de  $x=12$ , pero muestran una gran diversidad, ya que se encuentran 74,6 % de especies diploides ( $2n=2x=24$ ), 3,8% de triploides ( $2n=3x=36$ ), 14,8% de tetraploides ( $2n=4x=48$ ), 1,6 % de pentaploides ( $2n=5x=60$ ) y 5,5% de hexaploides ( $2n=6x=72$ ) (Contreras 2008). Por otra parte, la exitosa colonización de ambientes muy diversos, extendiéndose desde Estados Unidos hasta Argentina, se refleja en la gran variedad de fenotipos que pueden adquirir las especies silvestres. Algunas de éstas presentan apariencia muy semejante a la papa cultivada (Camadro 1996).

A lo largo de su evolución, las especies silvestres han estado sometidas a selección natural en condiciones diversas y muchas veces desfavorables. Como consecuencia, muchas especies han desarrollado características hereditarias muy valiosas para su supervivencia. Algunas de estas características incluyen resistencia a agentes biológicos adversos (insectos, virus, nematodos, bacterias y hongos); y a factores abióticos desfavorables (frío, calor, falta de agua). De igual forma, se encuentran atributos provechosos para su calidad culinaria o industrial, como un alto contenido de materia seca, proteínas y vitaminas (Camadro 1996).

Según investigaciones arqueológicas, en la costa chilena, se encuentran variedades silvestres de papa, desde hace 13.000 años, mucho antes del desarrollo de la agricultura. Además, se han encontrado gran abundancia de especies nativas en los Andes, lo que sugiere que éstas regiones son centros de diversidad primario para dichas especies. El lugar donde por primera vez se cultivó la papa fue en la región del lago Titicaca (norte de Bolivia), y en las altas mesetas de la Cordillera de los Andes. La fecha, el lugar y los autores de su domesticación todavía son desconocidos (Arce 2002). Los cultivares que hoy en día se utilizan proceden de unos pocos clones llevados a Europa desde el continente americano en el siglo pasado. Es por esto que su base genética es poco diversa, haciéndolos vulnerables a agentes patógenos y restringiendo la diversidad de los ambientes aptos para implantarlos. Por ello los fitomanejadores han reconocido desde hace años la necesidad de ampliar la base genética de la papa, cruzándola con especies silvestres y con variedades primitivas (Contreras 2008 y Camadro 1996). Las subespecies de *S. tuberosum* L. pueden cruzarse de manera natural con todas las especies incluidas en la sección Petota, a la cual pertenece. Pero se ha visto que sólo algunos de estos cruzamientos ocurren de manera natural. Esto es debido a que existen barreras que impiden dichos apareamientos, por lo que se dificultan los cruzamientos entre diferentes especies. (OECD 1997).

## Hibridación interespecífica

El término hibridación se aplica estrictamente al cruzamiento sexual entre individuos de fecundación cruzada. Sin embargo, en términos prácticos se usa el término hibridación para el cruzamiento de plantas de diferentes especies y recombinación cuando ocurre dentro de la misma especie. En ambos casos el fenómeno se da mediante la transferencia de polen de un individuo a otro, produciendo variabilidad en la descendencia (Donoso. 2004).

La hibridación interespecífica es un fenómeno que se da con frecuencia en plantas, y es poco común en animales. Esta facilidad para lograr hibridación que manifiestan las plantas se debe a que con frecuencia, no presentan mecanismos eficientes de aislamiento sexual, y a la gran longevidad de sus individuos en algunos casos. Dicha longevidad aumenta la probabilidad de la ocurrencia de eventos ambientales o génicos, que eventualmente favorezcan una hibridación (Donoso 2004). Ésta tendrá lugar, si las dos especies parentales se encuentran ubicadas en un determinado sitio, donde puedan ponerse en contacto y superar diferentes barreras para que se efectúe la polinización y la formación de un híbrido. Esto facilita el intercambio de alelos entre las dos especies, además de la segregación y recombinación de los factores génicos responsables de la adaptación de nuevas condiciones ecológicas (Rieseberg 2007). Los parentales del híbrido generalmente tienen diferentes requerimientos y tolerancia a los factores del medio ambiente, por lo que probablemente su descendencia no crecerá con éxito en el ambiente propio de uno de sus parentales (Donoso 2004). En cambio, si la hibridación se produce en condiciones ambientales favorables para los híbridos, se desarrollará una cantidad variable de los mismos, pudiendo ser alguno de ellos mejor adaptado que sus parentales al ambiente (Rieseberg 2007).

En la naturaleza existen una serie de mecanismos de aislamiento para especies diferentes, los que tienden a obstaculizar un efectivo intercambio genético entre ellas (Alarcón 2000). En general, estos mecanismos actúan en conjunto, pudiendo contribuir varios a la vez para impedir la producción de híbridos. De acuerdo con Alarcón (2000) los mecanismos se dividen en dos grandes grupos, los Mecanismos de Pre-fertilización o Precigóticos y los Mecanismos de Post-Fertilización o Postcigóticos. Dentro de los primeros, se destacan las siguientes barreras que impiden la formación del cigoto híbrido, *Aislamiento geográfico*, *Separación ecológica*, *Aislamiento temporal o estacional*, *Separación etológica indirecta*, *Aislamiento mecánico*. Éstas se caracterizan por intentar evitar el intercambio de polen entre las especies. El *Impedimento en la fertilización* y la *Incompatibilidad gamética* son barreras que actúan en la fase reproductiva de las especies parentales, ya sea por falla o ineffectividad del crecimiento del tubo polínico, o porque los gametos son incompatibles antes o en el momento de la fertilización.

Por otra parte, los Mecanismos de Post-Fertilización o Postcigóticos se caracterizan por la ocurrencia de la fertilización, formándose los cigotos híbridos, sin embargo ellos son inviables o dan lugar a híbridos débiles o

estériles. En éstos mecanismos se destacan las siguientes barreras, *Debilidad del híbrido*, *Esterilidad genética o cromosómica*, *Degeneración de la progenie híbrida*, las que se destacan por impedir el crecimiento o reproducción de los híbridos F1 o F2. Otra barrera a destacar por la relevancia en este estudio es la *Inviabilidad de la F1*, causada por la incapacidad del cigoto híbrido de crecer como embrión normal bajo las condiciones de desarrollo de la semilla, dado por desajustes entre los juegos de los cromosomas o entre el embrión en desarrollo y el endosperma que lo rodea, haciendo imposible la germinación para el cigoto formado.

En la naturaleza, cada mecanismo actúa con diferente intensidad; las barreras precigóticas tienden ser más determinantes que las barreras postcigóticas en la producción de híbridos interespecíficos (Lowry 2008). En el mejoramiento genético por otra parte, las barreras precigóticas pueden ser eludidas, en algunos casos mediante técnicas sencillas tales como, polinización asistida y regulación de las condiciones de luz y calor. Además se pueden usar técnicas más sofisticadas, como la polinización y fecundación *in vitro*. Esta última puede realizarse mediante la microinyección de células espermáticas o núcleos espermáticos aislados, en células individuales obtenidas de los sacos embrionarios. Otra técnica utilizada es la fusión de protoplastos, en la cual se aíslan protoplastos de dos especies diferentes, y se los fusiona para obtener un híbrido. Por otra parte, las barreras postcigóticas pueden ser eludidas facilitando la formación y el desarrollo de los embriones y de los híbridos. Una técnica usada para cumplir este propósito es el Rescate de Embriones, la cual consiste en aislar los embriones de los óvulos de una planta y cultivarlos en un medio estéril. Este deberá contener los nutrientes esenciales que les permita concluir su desarrollo normal. Esta técnica puede ser usada cuando los embriones carecen de nutrientes por causa de un endosperma desbalanceado (Levitus 2008)

### **Número de Balance del Endosperma (EBN)**

El endosperma normal balanceado es el encargado de nutrir al embrión en desarrollo. Se forma en la fecundación por la fusión de dos núcleos polares (haploides provenientes del parental femenino) del saco embrionario, y uno de dos núcleos germinativos del grano de polen (proveniente del parental masculino). En cruzamientos intra-específicos cuyas especies tienen la misma ploidía, el endosperma es resultado del balance especificado anteriormente. De ésta manera, los embriones de las semillas que se forman serán en su mayoría viables. No ocurrirá así en cruzamientos intra-específicos entre plantas con diferentes ploidías, donde se produce un desbalance en el endosperma, lo que determina el aborto de la mayoría de los embriones que se forman. Lo anterior constituye una regla general para la mayoría de las plantas, sin embargo ésta regla no se verifica en un cierto número de casos en las especies de *Solanum* (Hermsen 1994).

Para resolver y predecir el éxito de los cruzamientos entre especies emparentadas con *S. tuberosum*, cuando no intervienen barreras pre-cigóticas, se asignó un valor hipotético al endosperma de cada especie de papa. A este valor se lo denomina Número de Balance del Endosperma (EBN), que puede presentar los valores de 1, 2 o 4. Esta teoría sostiene que cuando la proporción de EBN que aporta el parental femenino, es el doble del aportado por el parental masculino (relación 2:1), los embriones serán eficazmente mantenidos por el endosperma balanceado (Johnston 1980). El EBN se modifica en conjunto con la ploidía del individuo, cualquier alteración en ésta, genera una alteración del mismo orden en el EBN. Por lo tanto, una duplicación en el número de cromosomas duplicaría el EBN, mientras que una haploidización lo reduciría a la mitad. De este modo la manipulación de la ploidía es el método más usado para superar este tipo de barrera. Es así que las duplicaciones del número de cromosomas en el material diploide o la haploidización de tetraploides y el uso de gametos no reducidos ( $2n$ ), son técnicas muy usadas (Johnston, 1980).

## **Gametos $2n$**

Los gametos no reducidos tienen el doble de la información genética que un gameto normal, y son producidos naturalmente por muchas especies de plantas. Uno de los grupos más estudiados es el de la papa y las especies relacionadas con ella, con el fin de aplicar este conocimiento en el mejoramiento genético (Carputo 2000). Existen distintos tipos de desviaciones de la meiosis que dan lugar a los gametos  $2n$ , las que son agrupadas en dos grupos de acuerdo a sus consecuencias genéticas. Las desviaciones que pertenecen al primer grupo se caracterizan por presentar mutaciones que afectan al huso mitótico, observándose un retraso de los cromosomas en la Anafase I (Veilleux 1983). Sin embargo, otros autores como Bielig (2003), afirman que estas irregularidades en la meiosis son causadas por la ausencia de citocinesis, fenómeno que ocurre en la microesporogénesis. En conclusión, en este primer grupo de desviaciones se obtienen gametos  $2n$  por RPD (Restitución en la Primera División), cuyas consecuencias genéticas equivalen a la restitución del nivel  $2n$  durante la primera división meiótica. El segundo grupo de desviaciones, ocurren en la megaesporogénesis, en la fase de meiosis II. Son causadas por mutaciones que son muy influenciadas por el ambiente. Por consiguiente, a partir de este grupo de desviaciones se obtienen gametos  $2n$  por RSD (Restitución en la Segunda División), cuyas consecuencias genéticas equivalen a la restitución del nivel  $2n$  durante la segunda división meiótica (Watanbe y Peloquin 1991).

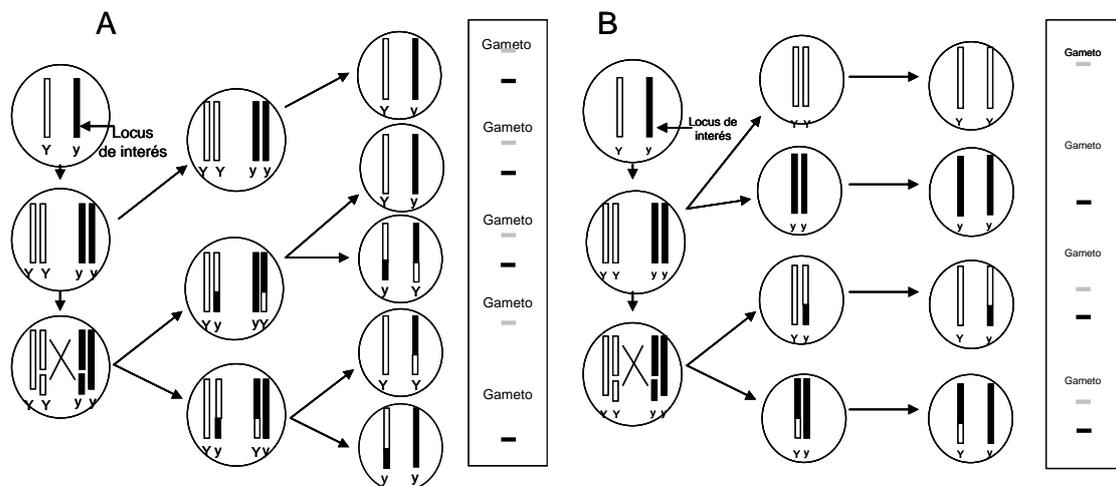


Figura 1. Representación esquemática de la producción de gametos no reducidos. En (A) se muestra la obtención de gametos 2n RPD, y en (B) para los gametos 2n RSD. Los recuadros muestran cómo se visualizaría en un gel de electroforesis el genotipo de cada gameto generado.

Si bien el resultado de ambos grupos de desviaciones son gametos 2n, la carga genética de los componentes es diferente. En el caso de gametos 2n RSD, se observan cromátidas hermanas en un mismo gameto 2n, dando como resultado una población más heterogénea de más gametos 2n homocigotos. Los gametos 2n RPD presentan todas las combinaciones posibles entre los cromosomas homólogos, pero no se encuentran cromátidas hermanas en un mismo gameto 2n. Estos gametos conservan la mayor parte de la heterocigosis de la planta madre (Veilleux 1983). Además se ha visto que especies diploides producen polen 2n en una mayor frecuencia (40,2%), que las especies tetraploides (9,4%) (Zlesak 2002). También se observa, que los parentales masculinos producen con más frecuencia gametos 2n RPD, y los femeninos producen gametos 2n RSD (Bielig 2003; Veilleux 1983).

En un estudio realizado por Masuelli *et al.* (1992) se caracterizaron accesiones de *S. commersonii* para la producción de gametos no reducidos. Se encontró que el 60% de las accesiones dieron lugar a gametos 2n, tanto femeninos como masculinos. También confirmaron que los triploides, producidos a partir de la hibridación con una especie diploide (2EBN), podrían ser fecundados con gametos normalmente reducidos de *S. tuberosum*.

### **Importancia de *S. commersonii* como recurso genético en Uruguay**

*Solanum commersonii* (cmm) es una especie silvestre diploide ( $2n=2x=24$ ; 1EBN). El centro de diversidad primario de esta especie se extiende desde provincia de Buenos Aires y el litoral argentino, pasando por Uruguay, hasta el extremo sur de Brasil (Hawkes 1994). Esta especie viene siendo destacada desde hace mucho tiempo por su alta potencialidad para el

mejoramiento de papa, ya que presenta resistencia al frío y sequías (Carputo 2007). Entre los factores bióticos, además de la resistencia a diferentes virus y hongos, se destaca su alta resistencia a la marchitez bacteriana causada por la bacteria *Ralstonia solanacearum* (Galván 2006). Lamentablemente el uso de *S. commersonii* en el mejoramiento de papa ha sido limitado debido a la presencia de barreras post-cigóticas a la hibridación con *S. tuberosum* ( $2n=4x$ ; 4EBN), que involucran el balance del endosperma (Galván 2006). No obstante, existen antecedentes en la introgresión de germoplasma de cmm en tbr. Uno de ellos es el trabajo de Carputo (1997), que utilizó el esquema de cruzamientos de la Figura 2, donde se realizó una duplicación del material genético de cmm, y una haploidización del material de tbr. Esta manipulación de la ploidía permite modificar el EBN de cada especie, logrando de esta forma eludir la barrera interespecífica. En primera instancia se cruzó tbr 2x con *S. phureja*, obteniéndose un híbrido 2x. Luego, el híbrido es cruzado con cmm 4x, resultando un segundo híbrido triploide. El triploide es posteriormente cruzado con tbr 4x, dando lugar a un tercer híbrido pentaploide. Seguidamente se realizan dos retrocruzamientos con tbr 4x como parental recurrente.

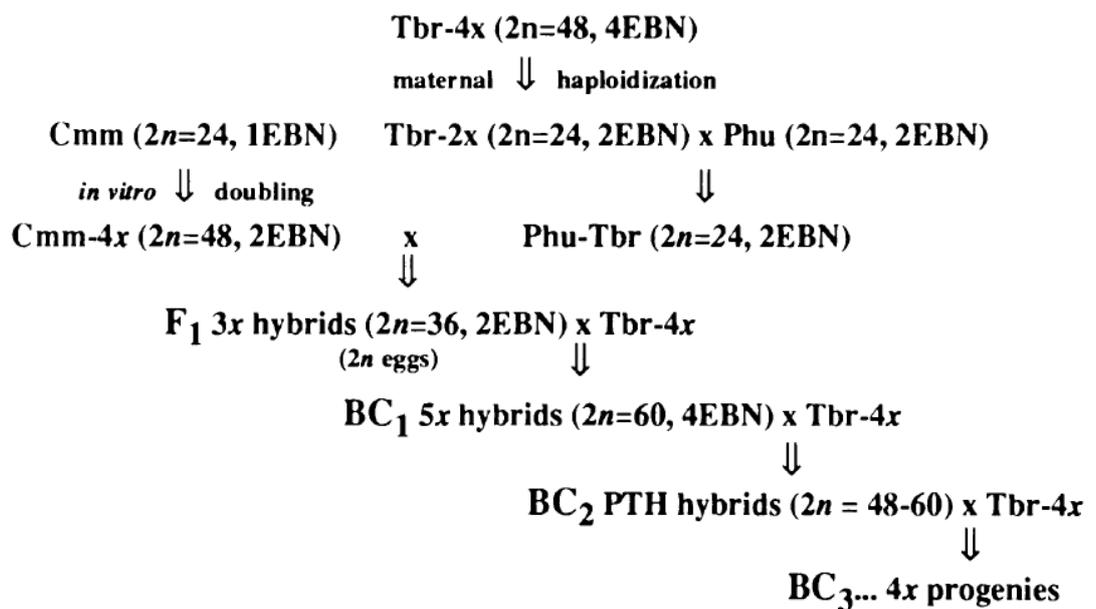


Figura 2. Esquema de introgresión utilizado por Carputo (1997).

A los diferentes ejemplares, se le contó el número de cromosomas mediante análisis citogenéticos de la mitosis. También se realizaron análisis de ADN mediante RAPDs, el que permite evidenciar las variaciones polimórficas (Carputo 1997). Además, se observó que los híbridos triploides obtenidos a partir de cruces  $4x \times 2x$  tienen dos genomas haploides de cmm y uno de phu-tbr. El híbrido tiene un EBN de 2 y se puede cruzar con variedades tetraploides (4EBN), sólo si forman gametos  $2n$ . En efecto, a partir de gametos  $2n$ , plantas de  $3x$  equilibran sus endospermas, con una

relación compatible (2:1). De esta manera se obtienen gametos viables (Carputo 1997).

Los cruzamientos entre los híbridos 3x x tbr-4x dieron lugar a progenies pentaploides, proporcionando evidencia de la fertilización de óvulos 2n (3x), de los padres triploides por los gametos masculinos n (2x) de las variedades cultivadas. Los híbridos pentaploides tienen dos genomas de cmm (1EBN) y tres genomas de tbr (3EBN). Como resultado, su EBN es de cuatro. Esto indica, que no hay barreras de balance endospermico a la introgresión de genes de cmm. Además, se observó que los pentaploides se desempeñaron mejor como progenitores femeninos, que como progenitores masculinos, probablemente porque los cromosomas en desequilibrio son mejor tolerados en progenitores femeninos (Carputo, 1997).

Mediante RAPDs, se determinó que marcadores de cmm estaban presentes en los híbridos 5x, a pesar de que éstos aparentan ser muy parecidos a tbr. Posibles causas de este hecho son que los marcadores se encuentran fuera de las regiones cromosómicas altamente expresadas, por lo que no se observan características fenotípicas de cmm. Otra hipótesis es la posible formación de bivalentes entre cromosomas homólogos, no permitiendo expresar los genes de cmm (Carputo, 1997).

Debido a que el apareamiento entre cromosomas homólogos se produce intercambio de material genético por recombinación, es importante estudiar la preferencia de apareamiento entre los cromosomas de cmm y tbr. De esta forma, se puede averiguar si los cromosomas de tbr pueden recibir genes de resistencia desde cromosomas de cmm a partir de apareamiento entre ellos, seguidos de procesos de recombinación. Es preciso señalar, que para lograr una introgresión exitosa de dichos genes, es necesario que se produzcan sucesivas recombinaciones entre los cromosomas de las dos especies, en diferentes etapas de un programa de mejoramiento. Mediante la selección de individuos resistentes en los retrocruzamientos, es posible eliminar las características no deseadas presentes en el genoma de cmm. Barone (2001) encuentra que los cromosomas de *S. tuberosum* se aparean regularmente con cromosomas de *S. commersonii*. A este tipo de apareamiento se le denomina Apareamiento no Preferencial, y se caracteriza por el entrecruzamiento y recombinación entre los cromosomas de diferentes orígenes como cmm y tbr. Otro mecanismo es el Apareamiento Preferencial, en el que se ve un apareamiento de cromosomas de una misma especie más frecuentemente que entre cromosomas de orígenes diferentes. En la Figura 3 se muestran los posibles apareamientos de los cromosomas de las tres especies usadas en este trabajo y cómo se visualizarían sus consecuencias genéticas con un marcador molecular codominante.

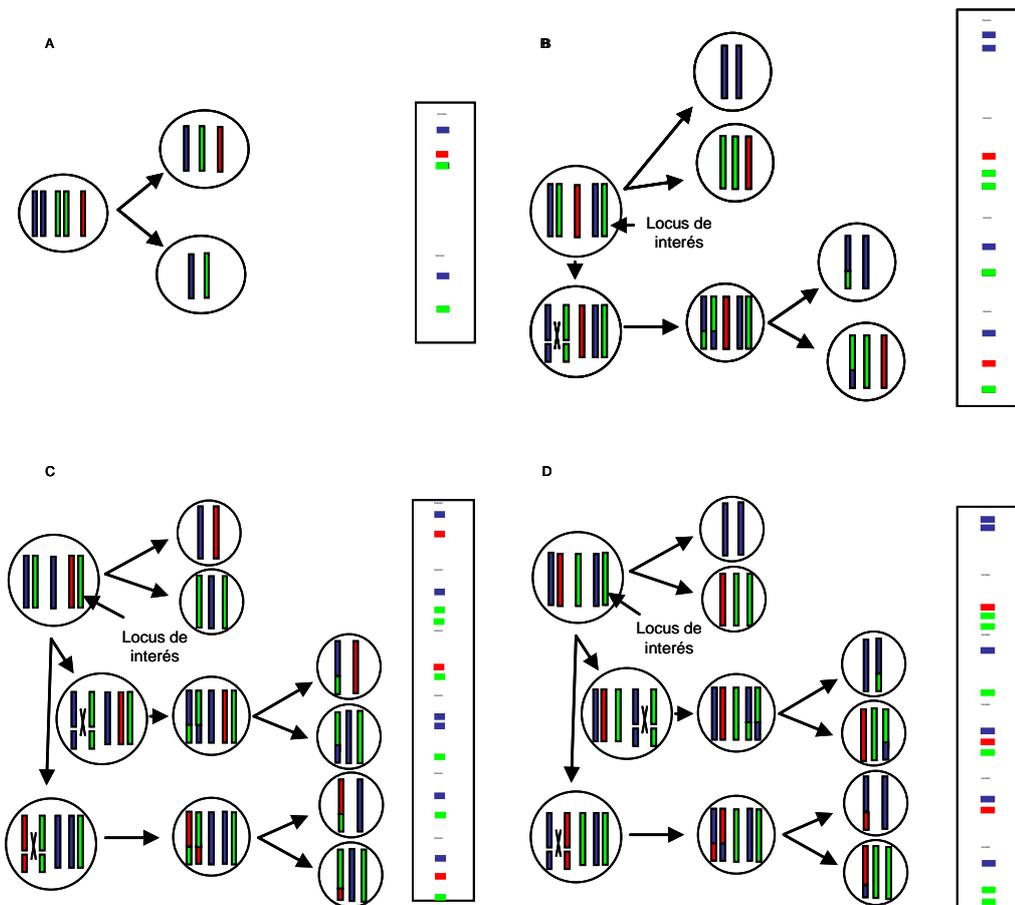


Figura 3. Representación esquemática de los diferentes mecanismos de apareamientos de cromosomas, con o si procesos de recombinación. Se representa en forma resumida el proceso de formación de gametos. Se muestran con un mismo color los cromosomas homólogos, donde el color azul corresponde a cmm, el verde a tbr, y el rojo a phu. En los recuadro se visualiza el genotipo de cada gameto resultante, usando marcadores moleculares (microsatélites).

- A. Apareamiento preferencial, los cromosomas se aparean con su homólogo.
- B. Apareamiento no preferencial, se aparean los cromosomas homeólogos, quedando libre el cromosoma de phu.
- C. Apareamiento no preferencial, el cromosoma de phu se aparea con uno de tbr.
- D. Apareamiento no preferencial, el cromosoma de phu se aparea con uno de cmm.

### **Esquema de introgresión propuesto**

El Proyecto nacional de mejoramiento de papa que lleva a cabo INIA, está orientado a desarrollar variedades comerciales con resistencia a enfermedades y adaptación general. El germoplasma mejorado que se espera obtener con la inclusión de *S. commersonii* en el acervo genético cultivado, podrá permitir incorporar factores de interés. Hace algunos años



se descartaron dos de ellos debido a la baja fertilidad de su polen. Los clones elegidos para continuar con la introgresión fueron: 06201.2 y 06201.6. (González. 2010).

En el segundo paso de introgresión los genotipos obtenidos del cruzamiento (cmm x Phu) x Tbr, presentaron porcentajes de polen fértil mayores al 30%, y en promedio 42%. Las progenies fueron caracterizadas por su resistencia a la marchitez bacteriana, observándose nuevamente segregación para la resistencia. Se seleccionaron los individuos más resistentes que presentaban un buen porcentaje de polen fértil, eligiendo los individuos 08302.2, 08302.4 y 08301.1 (González 2010).

En un tercer paso en el esquema de introgresión, se cruzaron los individuos seleccionados en el paso anterior con un nuevo clon de tbr, clon número 8809.2. En este caso, las progenies se evaluaron por resistencia a la marchitez bacteriana y luego de multiplicar los clones más resistentes, se pasaron a campo para evaluar la tuberización. Cabe destacar que estos híbridos presentan aún muchas características de su parental silvestre. Los clones seleccionados para hacer el seguimiento en este trabajo, debido a su alta resistencia y a su buena capacidad de tuberizar, son: 09505 y 09509 (González. 2010).

Este esquema de introgresión se basa en la producción de gametos femeninos no reducidos por parte de los puentes triploides y pentaploides de los dos primeros pasos. La producción de gametos masculinos no reducidos por parte de *S. commersonii* está bien caracterizada desde el punto de vista de su frecuencia y mecanismos citológicos (Massuelli 1992; den Nijs y Peloquin 1977; Novy y Hanneman 1991; Oliveira 2007 et al.). Por otro lado, Masuelli et al. (1992) mostró evidencia de que cmm tiene la capacidad de producir gametos femeninos no reducidos, al igual que los híbridos triploides originados por esta especie combinada con tbr y otras especies (Carputo 1997; Ehlenfeldt y Hanneman 1988). A pesar de estos antecedentes, los trabajos citados no analizan citológicamente el mecanismo de producción de estos gametos femeninos 2n. Werner y Peloquin (1987) sugieren que los mecanismos que controlan la producción de gametos femeninos 2n tienen un control genético independiente de los que afectan la microsporogénesis y describen algunos mecanismos de tipo RSD y RPD, sin embargo, tanto estos autores como otros (Masuelli et al. 1992) muestran que los individuos que producen gametos femeninos 2n también muestran una cierta frecuencia de alteraciones en la microsporogénesis.

### ***Retrocruza Asistida por Marcadores***

A través de los años, los fitomejoradores han seleccionado las mejores plantas basándose en su fenotipo. Este es un proceso lento, y por lo tanto costoso. Es por esto que se han buscado alternativas de selección que permitan mejorar y acelerar este proceso. Desde hace un tiempo resulta posible seleccionar en este tipo de programas al genotipo directamente en

lugar del fenotipo, mediante la denominada Selección Asistida por Marcadores (SAM) y por métodos citogenéticos (Olmos 2004).

La selección asistida por marcadores consiste en identificar una secuencia de ADN que codifique un gen (locus) de interés agronómico, o que se ubique próxima al mismo. Utilizar esta secuencia como herramienta en el proceso de selección le permite al mejorador independizarse de la expresión del gen y la interacción con el ambiente. La proximidad entre el marcador molecular y el gen es medida en unidades de mapeo (cM). Dependiendo de la proximidad que exista entre el marcador y el gen tenderán a permanecer juntos en mayor o menor medida durante las sucesivas generaciones, ya que al estar próximos, se dará una menor probabilidad de recombinación. De esta forma, cuando los fitomejoradores utilicen un germoplasma para el cual dispongan de un marcador ligado al locus de interés, la presencia del marcador en determinados individuos en la población indicaría que el gen responsable del fenotipo en cuestión también está presente en los mismos. Además, otra forma de emplear los marcadores para acelerar la introgresión, es seleccionar los individuos que presenten mayor cantidad de alelos del progenitor recurrente. De esta forma se seleccionan los individuos con mayor cantidad de germoplasma de este parental. (Olmos 2004).

Por otro lado, los métodos citogenéticos constituyen una herramienta muy importante para el mejorador. Dentro de estos, se destacan las técnicas clásicas, donde se pueden contar los cromosomas de los diferentes individuos del esquema, para confirmar las reducciones o no reducciones gaméticas. Otra técnica utilizada es el GISH (*genomic in situ hybridization*), la que permite colorear diferencialmente los cromosomas de distintos parentales. Esto facilita el análisis de la introgresión en híbridos interespecíficos, aprovechando la diferencia estructural entre genomas y, particularmente, la presencia de secuencias genoma-específicas (Herrera 2007)

### **Marcadores genéticos utilizados en el mejoramiento**

En los análisis genéticos se utilizan básicamente tres tipos de marcadores genéticos: Morfológicos, Bioquímicos (isoenzimas, proteínas) y Marcadores Moleculares (basados en ADN) (Bonamico 2004).

Los Marcadores morfológicos son características fenotípicas de fácil identificación visual, tales como forma, color, tamaño o altura. Estas características fenotípicas expresadas en el individuo, lo convierten en marcadores ambiguos debido a las influencias ambientales. Generalmente sólo se pueden identificar y medir en individuos completos o adultos (Bonamico, 2004).

Los marcadores bioquímicos incluyen a las proteínas y las isoenzimas o aloenzimas. Las proteínas presentan las siguientes ventajas: altos valores de polimorfismo, de estabilidad y reproducibilidad, además permiten un análisis rápido de decenas de muestras por ser un método simple y de bajo costo. Sin embargo, detectan pocos loci y los distintos patrones

electroforéticos detectados pueden tener una base molecular compleja que puede incluir sustituciones, inserciones y pérdidas nucleotídicas. También las diferencias pueden ser causadas por modificaciones pre y post transcripción y/o traducción. Por otro lado, las isoenzimas presentan las ventajas de su simplicidad, bajo costo y una cobertura del genoma de 10-20 *loci* por especie. La expresión alélica es de tipo codominante. Entre sus desventajas se incluye un nivel bajo de polimorfismo al presentar pocos alelos por *locus*, especialmente cuando la base genética es estrecha, y la presencia de epistasis e influencias ambientales. Cabe destacar que un marcador codominante logra distinguir todas las formas alélicas por *locus*, lo que permite establecer comparaciones entre especies, poblaciones de una misma especie, y detectar la presencia de híbridos e introgresión de genes. En cambio, un marcador dominante solo distingue un solo alelo por *locus* (Becerra 2000).

Por otro lado, el análisis de ADN presenta múltiples ventajas, permitiendo el análisis simultáneo de un gran número de muestras y entregando información genética precisa e independiente del ambiente. Además, el ADN puede ser extraído a partir de cantidades ínfimas de tejido de cualquier órgano somático y estado de desarrollo de la planta. Esto permite la obtención de resultados en un corto plazo (Mathias 2007). Dado que los marcadores moleculares son un punto de referencia en un cromosoma, que pueden o no corresponder a un gen, y funcionan como señaladores de diferentes regiones del genoma, éstos son ampliamente utilizados en genética humana, vegetal, animal y microbiana. Además permiten evidenciar variaciones (polimorfismos) en la secuencia del ADN entre dos individuos, sin importar que éstas modifiquen su fenotipo. En relación a los vegetales son de utilidad en estudios evolutivos y de genética poblacional, manejo de bancos de germoplasma, identificación, protección legal de germoplasma, mapeo, selección asistida por marcadores y clonado de genes (Echenique, 2004).

La investigación en esta área, se ha visto favorecida con la disponibilidad de una mayor cantidad de marcadores, aquellos basados en Fragmentos de Restricción Polimórficos (RFLP) y en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Ambas técnicas han derivado en múltiples técnicas como son la Amplificación de ADN al Azar (RAPD), Fragmentos Polimórficos de ADN Amplificados (AFLP), minisatélites (VNTR) y microsátélites (SSR), entre otros (Becerra 2000). Al momento de elegir un marcador es importante tener en cuenta, que debe contar con los siguientes requisitos, debe ser altamente polimórfico o variable dentro y entre especies, de herencia mendeliana no epistática (sin interacción entre genes), insensible a los efectos ambientales, codominante, de rápida identificación y simple análisis y de posible detección en los estadios tempranos del desarrollo de la planta (Echenique 2004).

Tabla 1. Comparación de características generales de los marcadores genéticos. Tomado de Becerra (2000). RFLP: Fragmentos de restricción polimórficos. RAPD: Amplificación de ADN al azar. VNTR: Número variable de repeticiones en tandem. AFLP: Amplificación de fragmentos polimórficos. SSR: Secuencias simples repetidas

Característica	Proteínas	Isoenzimas	RFLP	RAPD	VNTR	AFLP	SSR
Polimorfismo	Alto	Bajo	Bajo-alto	Medio-alto	Medio-alto	Medio-alto	Alto
Estabilidad ambiental	Alta	Moderada	Alta	Alta	Alta	Alta	Alta
Número de loci	Bajo	Medio	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto
Reproducibilidad	Alta	Moderada-alta	Alta	Moderada-alta	Alta	Alta	Alta
Aplicación	Rápida-barata	Rápida-barata	Lenta-cara	Rápida-cara	Intermedia	Lenta-cara	Lenta-cara

A partir de la Tabla 1 se concluye, que los marcadores SSR resultan ser la mejor elección a emplear en este trabajo. Esto es debido a que presentan altos valores de polimorfismo, lo que permite encontrar varios alelos por locus, pudiendo evidenciar variabilidad entre los individuos y encontrar fácilmente alelos especie específicos parentales en cada híbrido. Es por esto que son considerados por la mayoría de autores como la más poderosa herramienta para los estudios de genética de poblaciones (Echenique, 2004). Además como son marcadores codominantes, se puede ver la contribución de ambos parentales por lo que son mucho más informativos para definir genotipos individuales y poder realizar mapas de ligamiento, que los marcadores dominantes como los RAPDs y los AFLPs. La estabilidad presentada favorece el seguimiento de los marcadores a través de las generaciones de individuos. Los SSR se pueden confeccionar para un gran número de loci. La alta reproducibilidad permite repetir los análisis, obteniendo los mismos resultados, y además intercambiar información entre laboratorios. Por otro lado, para estudiar el modo de producción de los gametos no reducidos, uno de los objetivos de éste trabajo, es conveniente estudiar loci heterocigotas, y este tipo de marcadores por el alto número de alelos por locus que se puede identificar permite estudiar la segregación directamente. Como consecuencia, por varios motivos los marcadores SSR se consideran los más adecuados para este trabajo.

## Microsatélites

Los microsatélites (SSR), son regiones del genoma hipervariables constituidas por repeticiones en tándem de unos pocos pares de bases (1 a 6) flanqueadas por secuencias de copia única. La base genética del polimorfismo detectado en microsatélites, se basa en la variabilidad del número de repeticiones en tándem, y consecuentemente en el tamaño del microsatélite amplificado en diferentes individuos de una especie. De esta forma, se logran distinguir varios alelos por locus. Gracias al polimorfismo que presentan por locus (multialelismo) se los considera los marcadores ideales

para el mejoramiento (Echenique, 2004). Sin embargo, el número de secuencias de microsatélites en el genoma es limitado. Esto restringe su empleo para la elaboración de mapas genéticos, cuando se compara con el número potencialmente ilimitado de loci correspondientes a los RFLPs, RAPDs y AFLPs. Otras limitaciones para su empleo son el esfuerzo y el gasto necesario para su desarrollo. No obstante, puede ser compensado con la posibilidad de usar los mismos cebadores en más de una especie (Becerra 2000). Esto es debido a que existe un cierto grado de conservación de los microsatélites entre genomas de especies de un mismo género. Sin embargo, la transferencia de microsatélites es muy limitada, en especial, entre individuos de diferente género (Barbará 2007).

La transferibilidad de los microsatélites entre especies relacionadas, depende de la homología de las secuencias de ADN en las regiones flanqueantes. El éxito en la transferibilidad de los microsatélites, también depende de la distancia evolutiva entre la especie para la cual fueron diseñados los cebadores, y la especie que se quiere estudiar utilizando dichas secuencias. Existe evidencia de que sus secuencias flanqueantes pueden no conservarse mucho a través de las especies de algunos géneros. De esta forma no son transferibles a especies no relacionadas directamente (Zucchi *et al.* 2003; Echt *et al.* 1996). Se observa mayor éxito en la transferencia de microsatélites entre especies, cuando éstas tienen tiempos de generación largos (especies perennes), sistemas de reproducción mixtos o alogamia, y cuando el tamaño del genoma en la especie blanco es más pequeño que el de la especie fuente. En los casos donde se encuentra transferencia, la región amplificada puede no contener una repetición, pudiendo ser más corta y menos variable (Barbará *et al.* 2007). Cabe destacar que se encuentran casos de transferibilidad de microsatélites, como es el caso de los cereales, donde se ha detectado una limitada conservación de las secuencias microsatelitales dentro del género. En estos casos se da que las amplificaciones en la especie, para la que no fueron diseñados los cebadores, muestran muy baja o nula variabilidad. No obstante, debido a la proporción relativamente baja de transferibilidad de los microsatélites entre genomas homoeólogos, probablemente son excelentes marcadores para realizar seguimientos de introgresiones entre especies debido a su gran especificidad (Sourdille 2001).

El ADN conteniendo secuencias tipo microsatélites puede ser amplificado usando la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Esta técnica permite la amplificación de fragmentos específicos hasta concentraciones muy elevadas a partir de pequeñas cantidades de ADN molde, el que puede provenir de ADN genómico, del que se requieren idealmente entre 300 ng a 1 µg. Para ello es necesario, además del ADN molde, una ADN polimerasa termoestable, nucleótidos (desoxinucleótidos trifosfato, dATP, dCTP, dGTP y dTTP) y unos pequeños fragmentos monocatenarios de ADN. Estos, por complementariedad de bases se pueden unir al ADN molde y sirven de cebadores a la polimerasa, proporcionando especificidad del fragmento amplificado ya que se copia el fragmento

contenido entre ellos. Dichos cebadores deben cumplir determinados requisitos, como una longitud comprendida entre 18 y 25 nt, no deben ser complementarios ni formar estructuras secundarias. Además, se deben evitar la presencia de desoxinucleótido G en posición 3' terminal, y la concentración aceptable para cada oligonucleótido es de 0.05 a 1.0  $\mu\text{L}$  por cada 100  $\mu\text{L}$  de reacción (Torres 1995). Cabe señalar, que el PCR es una reacción en cadena porque las hebras de ADN de la síntesis, sirven a su vez de molde para reacciones de síntesis en ciclos posteriores. Tras unos 30 ciclos, el PCR habrá generado aproximadamente un millón de copias de la secuencia diana específica (Levitus 2008).

Básicamente cada ciclo de PCR consta de tres etapas, la primera corresponde a la desnaturalización del ADN, seguida por una etapa de incubación del ADN con los cebadores, y una fase final de síntesis de nuevo ADN.

i) *Desnaturalización del ADN*: se calienta la muestra a 93-95°C, durante unos 30 segundos, consiguiendo la separación de la doble hélice en dos cadenas sencillas, debido a la rotura de los enlaces de hidrógeno y separándose las bases complementarias.

ii) *Unión específica de los cebadores a las cadenas sencillas mediante complementariedad de bases*: a temperaturas que varían entre 50 y 70 °C, dependiendo de la  $T_m$  (temperatura de fusión) del duplex esperado y durante un tiempo aproximado de unos 20 segundos, cada uno de los cebadores se une a una cadena diferente delimitando la secuencia diana que se pretende amplificar.

iii) *Síntesis de ADN*: típicamente a 70-75 °C, comienza a funcionar la replicación incorporando nucleótidos sobre los primers y haciendo una copia completa y exacta de la cadena molde. (Levitus 2008).

De acuerdo a Torres (1995) se deben tener los siguientes recaudos para lograr una exitosa amplificación de los fragmentos de ADN deseados. En primer instancia, es importante tener una concentración de ADN genómico a una concentración de entre 300 nanogramos a 1  $\mu\text{g}$ , ya que concentraciones fuera de este rango pueden entorpecer la reacción de PCR. Cabe destacar, que las altas concentraciones de proteína en las muestras, dificultan dicha reacción, es por esto que es fundamental partir de ADN genómico con la mínima cantidad de proteínas posible. En segundo lugar, la concentración de los desoxirribonucleótidos de trifosfato, es un punto clave a tener en cuenta, ya que a altas concentraciones disminuye la especificidad de la reacción, mientras que a bajas concentraciones, disminuye el índice de incorporaciones erráticas de los nucleótidos. Concentraciones ideales van desde 20 a 200  $\mu\text{M}$ . Finalmente otro punto a tener en cuenta, son las consecuencias de posibles contaminaciones, por lo que se debe trabajar en forma cuidadosa en el procedimiento del laboratorio. Además, es necesario realizar controles positivos y negativos para monitorear y revelar los contaminantes.

## **Objetivos**

INIA esta llevando a cabo cruzamientos interespecíficos entre las especies silvestres *S.commersonii*, *S. phureja* y *S. tuberosum* con el fin de introgresar genes de resistencia a los cultivares de papa. Cabe destacar, que la producción de gametos no reducidos por cmm, y el apareamiento de los cromosomas de la especie del programa, son puntos claves para lograr la introgresión de dichos génes. De ahí que, con este trabajo se buscará optimizar la selección de los híbridos competentes, y entender la segregación de los cromosomas de las especies que llevaran consigo los genes que darán lugar a las resistencias deseadas. Por estos motivos, se plantean los siguientes objetivos:

### **Objetivo General:**

\* Monitorear la introgresión de cromatina de *S.commersonii* en el germoplasma de papa, en el programa de cruzamientos interespecíficos que lleva adelante INIA.

### **Objetivos específicos:**

\* Determinar el modo de producción de los gametos no reducidos en que se basa el esquema de introgresión de INIA.

\* Estudiar el mecanismo de apareamiento cromosómico en los híbridos pentaploides.

# Materiales y métodos

## ***Extracción de ADN***

La extracción de ADN se llevó a cabo mediante el protocolo CTAB de Doyle y Doyle (1987), con algunas modificaciones. Para la molienda del tejido (10-20 mg) se utilizó nitrógeno líquido. Luego, en la precipitación del ADN se agregó acetato de amonio 7.5M junto con iso-propanol, y la precipitación se dió a -20°C. Después se realizaron dos lavados con alcohol 70% y 95% respectivamente. Inmediatamente después de haberse evaporado el alcohol el ADN se resuspendió en agua mili-Q. Para verificar la calidad de las extracciones de ADN genómico, se corrieron las muestras en geles de agarosa al 2%, en una solución amortiguadora TBE 1X (90mM tris, 90mM ácido bórico, 20mM EDTA pH=8) a 100 voltios constantes. Para esto, se cargaron 8 µL de muestra en cada pozo, junto con 2 µL de solución amortiguadora de carga para geles de agarosa. La solución de carga está compuesta por glicerina 50%, azul de bromofenol 0.25% y xileno cianol FF 0.25%. En uno de los carriles se cargó un marcador de peso molecular. En último lugar, se tiñó el gel con bromuro de etidio (10 mL de bromuro de etidio 10 mg/mL diluidos en 100 mL de H<sub>2</sub>O destilada) durante 5 min.

Por otro lado se cuantificó la concentración y pureza del ADN extraído, a través de la medida de la absorbancia de cada una de las muestras, utilizando espectrofotometría de luz UV a 260nm, longitud de onda que absorben las bases nitrogenadas del ADN. Para estimar la pureza, se realizó el cociente 260/280 nm, el cual debe ser mayor a 2 para dar como válido el valor de la concentración, ya que nos informa la cantidad de proteína (los aminoácidos aromáticos absorben a 280) que presenta la muestra. Para obtener estos valores se utilizó un equipo Nano Drop 2000 Spectrophotometry

## ***Elección de loci de SSR a utilizar***

Los cebadores utilizados en este trabajo fueron seleccionados de acuerdo a su ubicación en el genoma, eligiendo dos cebadores por cromosoma suficientemente alejados entre sí, los que se muestran en la Tabla 2. La ubicación de estos marcadores en el genoma de papa utilizada para realizar esta selección fue tomada de Ghislain (2009) y se muestra en la Figura 5.

Tabla 2. Cebadores utilizados, tomados de Ghislain (2009). Se observa el nombre del cebador, el motivo de repetición, la secuencia del cebador, la localización del locus en el mapa mostrando en que cromosoma esta presente, y la cantidad de loci que distingue.

Nombre	Motivo de repetición	Secuencia de cebadores:		Localización en mapa	Multi Loci
		Directo(arriba)/	Reverso(abajo)		
STG0010	(TG) <sub>n</sub>	CgATCTCTgCTTTgCaggTA	gTTCATCACTACCgCCgACT	III g	1
STG0012	(AAG) <sub>n</sub>	ACACgCTgATgTTgAggATg	CTTAAAAACACgCCACCCAT	IX g	1
STG0016	(AGA) <sub>n</sub>	AgCTgCTCAgCATCAAgAgA	ACCACCTCAggCACTTCATC	I g	1
STG0021	(AAGA) <sub>n</sub>	TgCCTACTgCCCCAAACATT	ACTggCTgggAAgCATAACAC	V g	1
STG0025	(AAAC) <sub>n</sub>	TggAATCCgAATTACgCTCT	AggTTTTACCACTCgggCTT	X g	1
STG0033	(CGG) <sub>n</sub>	gCTCATTgACTgCTAAACCC	gAAAgAATTgTgCCgTCgAT	II g	1
STI0001	(AAT) <sub>n</sub>	CAGCAAAATCAGAACCCgAT	ggATCATCAAATTCACCgCT	IV fg	1
STI0003	(ACC) <sub>n</sub>	ACCATCCACCATgTCAATgC	CTCATggATggTgTCATTgg	VIII fg	1
STI0009	(AGC) <sub>n</sub> (AAC) <sub>n</sub>	gCgAAAACCTTgAAgCAACT	CTgCTgTTgCTgTTgATggT	I fg	1
STI0012	(ATT) <sub>n</sub>	gAAgCgACTTCCAAAATCAgA	AAAgggAggAATAgAAACCAAAA	IV f	1
STI0014	(TGG) <sub>n</sub> (AGG) <sub>n</sub>	AgAAACTgAgTTgTTTgggA	TCAACAgtCTCAgAAAACCCCTCT	IX fg	1
STI0026	(TA) <sub>n</sub> (GT) <sub>n</sub>	CAACgCTACTCAATggCTCA	ACAACCTAgAACgAgaGgAACA	IV f	1
STI0030	(ATT) <sub>n</sub>	TTgACCCTCCAACATAgATTCTTC	TgACAACCTTAAAgCATATgTCAgC	XII fg	1
STI0033	(AGG) <sub>n</sub>	TgAgggTTTTCAgAAAgggA	CATCCTTgCAACAACCTCCT	VII fg	1
STM0003	(AC) <sub>n</sub> (AT) <sub>n</sub>	ggAgAATCATAACAACCAg	AATTgTAACTCTgTgTgTgTg	XII defg	1
STM0019a,b	(AT) <sub>n</sub> (GT) <sub>n</sub> (AT) <sub>n</sub> (GT) <sub>n</sub> (GC) <sub>n</sub> (GT) <sub>n</sub>	AATAggTgTACTgACTCTCAATg	TTgAAgTAAAATCCTAgTATgTg	VI dg	2
STM0031	(AC) <sub>n</sub> ...(AC) <sub>n</sub> GCAC (AC) <sub>n</sub> (GCAC) <sub>n</sub>	CATACgCACgCACgTACAC	TTCAACCTATCATTgTgAgTCg	VII dg	1
STM0037	(TC) <sub>n</sub> (AC) <sub>n</sub> AA (AC) <sub>n</sub> (AT) <sub>n</sub>	AATTTAACTTAgAAgATTAgTCTC	ATTTggTTgggTATgATA	XI dg	1
STM1019	(ATC) <sub>n</sub>	TAgATTTTATTATTCCCAACAAGCA	CAACTACCTTCTCCCCACATAg	VI eg	1
STM1053	(TA) <sub>n</sub> (ATC) <sub>n</sub>	TCTCCCCATCTTAATgTTTC	CAACACAgCATACAgATCATC	III dg	1
STM1104	(TCT) <sub>n</sub>	TgATTCTCTTgCCTACTgTAATCg	CAAAGTggTgTgAAgCTgTgA	VIII deg	1
STM1106	(ATT) <sub>n</sub>	TCCAgCTgATTggTTAggTTg	ATgCgAATCTACTCgTCATgg	X dg	1
STM2028	(TAC) <sub>n</sub> ...(TA) <sub>n</sub> ...(CAT) <sub>n</sub>	TCTCACCAgCCggAACAT	AAgCTgCggAAgTgATTTTg	XII df	1
STM5114	(ACC) <sub>n</sub>	AATggCTCTCTCTgTATgCT	gCTgTCCCAACTATCTTTgA	II eg	1
STPoAc58	(TA) <sub>n</sub>	TTgATgAAAggAATgCAgCTTgTg	ACgTAAAAGAAgTgAgAgTACgAC	V eg	1

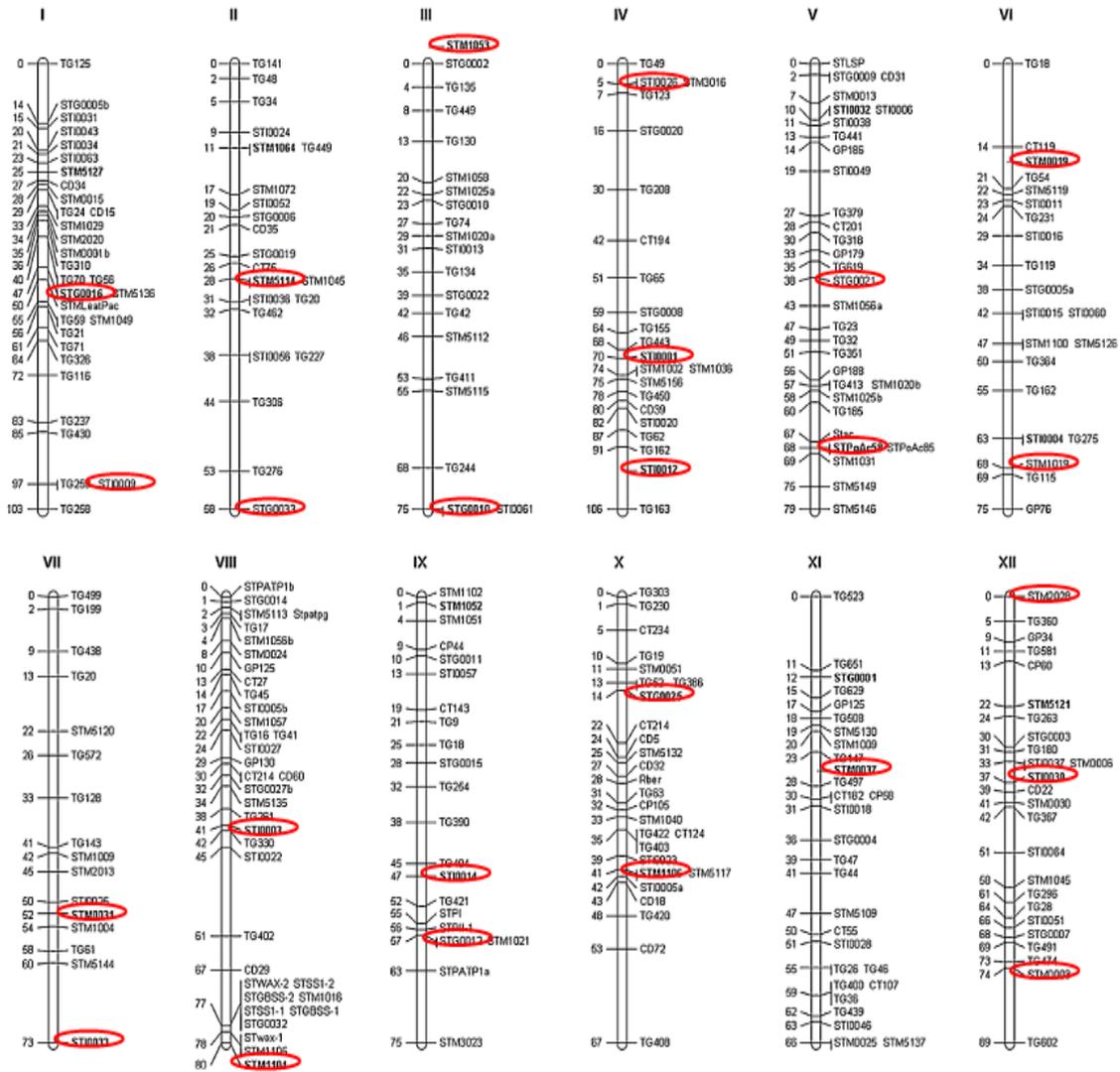


Figura 5, Ubicación de los cebadores en los cromosomas, tomado de Ghislain (2009). Se indican los loci analizados en este trabajo con círculos rojos.

## Amplificación y detección de los marcadores moleculares

Para permitir la detección del fragmento amplificado en el secuenciador, el cebador directo de cada pareja se extendió con una secuencia conocida (M13: CACGACGTTGTAAAACGAC) y se agregó a la mezcla una cantidad de cebador M13 conjugado a una molécula de fluorocromo (6-FAM). De este modo para todas las reacciones de PCR se realizó una mezcla que consistió en: 2 µl de ADN resuspendido en agua mili-Q (15-30 ng de ADN), 1X de buffer PCR (Tris 20 mM, KCl 50mM, pH 8,4), 2.5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,30 mM de cada dNTP, 0.02 µM de M13, 0.02 µM de cada cebador y 1.5 U de enzima Taq polimerasa, siendo de esta forma el volumen final de la mezcla de 15 µL. Por otra parte, el programa de PCR consistió en

un ciclo de desnaturalización a 94°C por 4 min; 33 ciclos con desnaturalización a 94°C por 1 min, alineamiento de 48 a 55°C por 1 min dependiendo del cebador, y elongación a 72°C por 1 min; finalmente un ciclo de extensión a 72°C por 4 min. Este programa fue tomado de Ghislain (2009), con algunas modificaciones.

Para visualizar los productos de la amplificación se separaron las muestras en geles de agarosa al 2%, en las mismas condiciones que para las muestras de extracción de ADN descritas anteriormente. Luego, todas las muestras que manifestaron una amplificación de fragmentos de ADN a través de una visualización de bandas de entre 100 y 350 pares de bases, fueron enviadas a resolver mediante electroforesis capilar en un secuenciador automático de 4 capilares, ABI3130 (Applied Biosystems). En último lugar, los electroferogramas resultantes fueron analizados usando el software libre Peak Scanner (Applied Biosystems) para realizar la asignación de alelos y formar una base de datos conteniendo los genotipos de cada una de las muestras.

# Resultados

En este trabajo, se lograron amplificar 25 loci distribuidos equitativamente, obteniéndose información en la mayoría de los casos, para dos loci por cromosoma. Además, se detectaron en el conjunto de materiales analizados varios alelos por locus, lo que permitió observar variabilidad entre individuos de la misma especie, e identificar sin ambigüedad material genético de las especies parentales en los híbridos avanzados. Todos los genotipos observados se muestran en el Apéndice 1. La calidad de los electroferogramas fue en general adecuada para su interpretación. Se muestra un ejemplo de los electroferogramas obtenidos en la Figura 6. A partir de ellos se confeccionó la tabla presentada en el Apéndice 1 y a partir de ella se agrupó la información de cada locus en un gráfico para los individuos involucrados en cada cruzamiento individual. De esta manera se obtiene un gráfico para cada cebador, y se facilita la visualización de los resultados e interpretación del origen de las bandas. Se presenta en esta sección la información para aquellos loci en que las bandas pudieron ser asignadas a cada progenitor en cada caso sin ambigüedad.

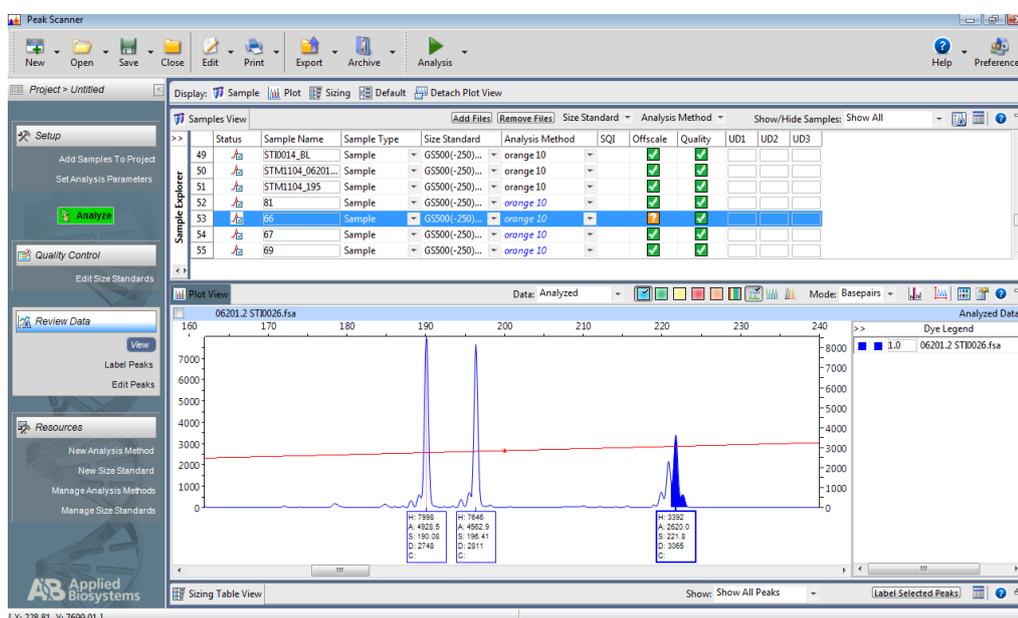


Figura 6, Electroferograma del cebador ST10026, individuo cpx-1 (triploide)

## ***Materiales parentales***

Las especies *cmm* y *phu* son diploides, por lo tanto se espera que los marcadores moleculares codominantes logren distinguir hasta dos alelos. En este caso se encontró que para todos los loci que se pudieron analizar sin ambigüedad (17 loci), el parental *cmm* es heterocigoto, mientras el parental

phu es heterocigoto para 16 loci. Por otro lado, la especie tbr es tetraploide, por lo que se espera observar hasta cuatro alelos, si el clon es completamente heterocigoto. En este estudio se encontró 15 loci heterocigotos de 17 posibles. En las Figuras 7, 9 y 11 los alelos fueron representados en forma de bandas, a las cuales se les asignó un color identificando la especie de la cual provienen. Para esto se utilizó el siguiente código de colores: las bandas de color azul fueron asignadas para alelos de cmm; bandas de color rojo representan alelos de phu, bandas de color verde claro para alelos del primer tbr usado en el programa (t1); y el color verde oscuro representa alelos del segundo tbr (t2).

### **Triploides**

Los triploides cxp-1 y cxp-2 son el resultado del cruzamiento entre cmm y phu. Para el análisis molecular de los híbridos triploides se usaron 17 loci, ya que éstos no presentan superposición de alelos entre los individuos de cmm y phu utilizados como parentales. En todos los casos se observó el aporte de ambos parentales a la constitución genética de los híbridos. En la Figura 7 se aprecia la constitución genética de los triploides para algunos loci, y la información obtenida para todo los loci interpretables en este cruzamiento se sintetiza en la Tabla 3. Se destaca que en todos los loci analizados los híbridos recibieron dos alelos de cmm y uno de phu.

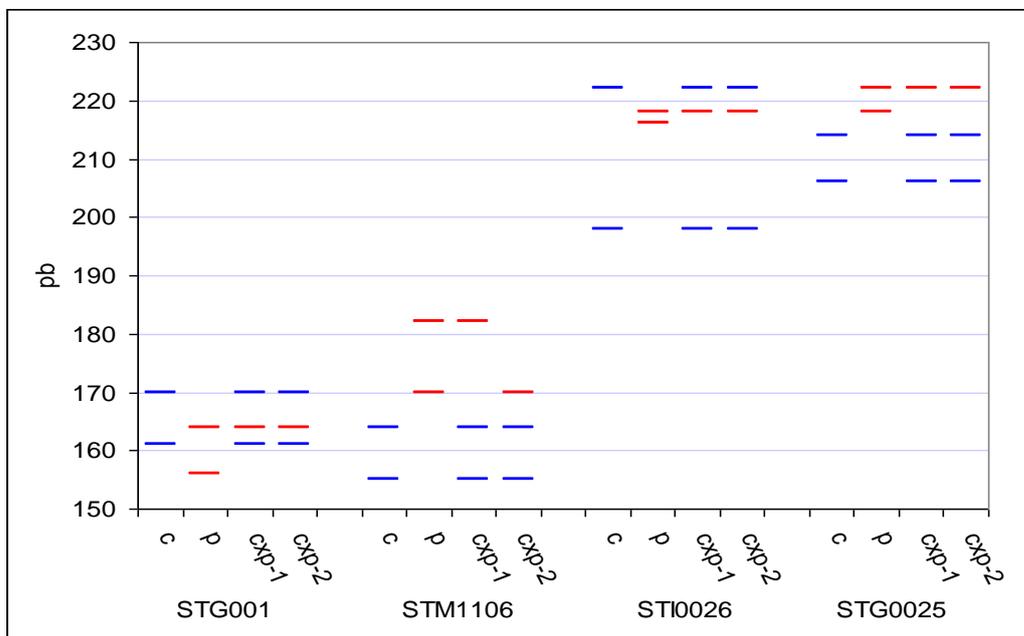


Figura 7, Composición genética de los triploides cxp-1 y cxp-2 para cuatro cebadores. Para cada cebador, las primeras dos columnas muestran la constitución genética de los parentales (c y p) y en las dos columnas restantes se muestra para los dos híbridos triploides. En color azul se representan los alelos de cmm, y en rojo los alelos de phu.

En la Tabla 3 se muestra la heterocigosis de los distintos loci interpretables en cmm y phu, y se indican los alelos heredados por los

triploides. Además, a partir de ésta tabla, se calcula el porcentaje de heterocigosis de cmm y de phu que se transmitió al los triploides. En los 17 loci analizados en este caso, se observa que en todos ellos el triploide recibió el 100% de la heterocigosis de cmm (ambos alelos). En el caso de phu, se observa que se transmite la mitad (un alelo) de su material genético, esto es un alelo cada híbrido para cada locus. Aproximadamente en la mitad de los casos los triploides heredan diferentes alelos de phu.

ador	Ceb	Cromosoma	<sup>a</sup> cmm	<sup>b</sup> phu	<sup>c</sup> -1 cxp	<sup>d</sup> -2 cxp	Segregación de los alelos de phu <sup>e</sup>
0037	STM	11	X	X	X	X	
030	STI0	12	X	X	X	X	X
1104	STM	8	X	X	X	X	X
033	STI0	7	X	X	X	X	X
oAc58	STP	5	X	X	X	X	
0019a,b	STM	6	X	X	X	X	
001	STI0	4	X	X	X	X	
0031	STM	7	X	X	X	X	X
026	STI0	4	X	X	X	X	
014	STI0	9	X	X	X	X	
2028	STM	12	X	X	X	X	
0025	STG	10	X	X	X	X	
0012	STG	9	X	X	X	X	
012	STI0	4	X	X	X	X	X
5114	STM	2	X	X	X	X	X
1106	STM	10	X	X	X	X	X
0033	STG	2	X		X	X	

Tabla 3, Heterocigosis de los parentales y presencia de sus alelos en los triploides.

- a. Loci en que el parental cmm es heterocigoto.
- b. Loci en que el parental phu es heterocigoto
- c. y d. Loci para los cuales el híbrido muestra ambos alelos de cmm
- e. Loci en los cuales se observó la presencia de diferentes alelos de phu en el híbrido

A partir de la Tabla 3 se realiza el esquema de la Figura 8, donde se muestra en forma resumida el aporte de material genético de cada parental.

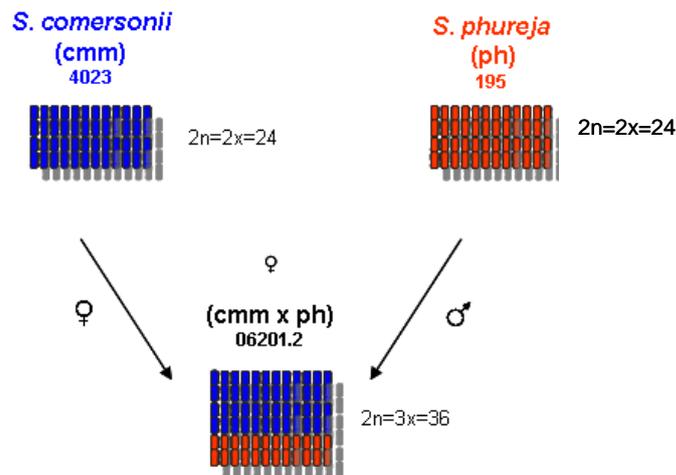


Figura 8, Representación esquemática de un cruzamiento entre cmm y phu. Se muestra que el parental femenino (cmm) trasmite dos genomas, mientras que el parental masculino (phu), aporta la mitad de sus genes y por lo tanto uno de sus alelos en caso de ser heterocigoto para el locus en cuestión.

## ***Pentaploides***

Estos pentaploides son el resultado del cruzamiento entre el triploide cxp-1 con t1 en los dos primeros casos, y cxp-2 con t1 en el caso de cxp-2xt1-1. Para el análisis molecular de esta etapa del programa se usaron 17 loci, ya que éstos no mostraron superposición de alelos entre los parentales triploides y tbr1. En todos los casos se observó el aporte de ambos parentales a la constitución genética de los híbridos. De este modo, en la Figura 9 se representa la constitución genética de los pentaploides, destacando que recibieron en todos los casos la constitución genética intacta del híbrido triploide parental y dos alelos de tbr para los loci analizados.

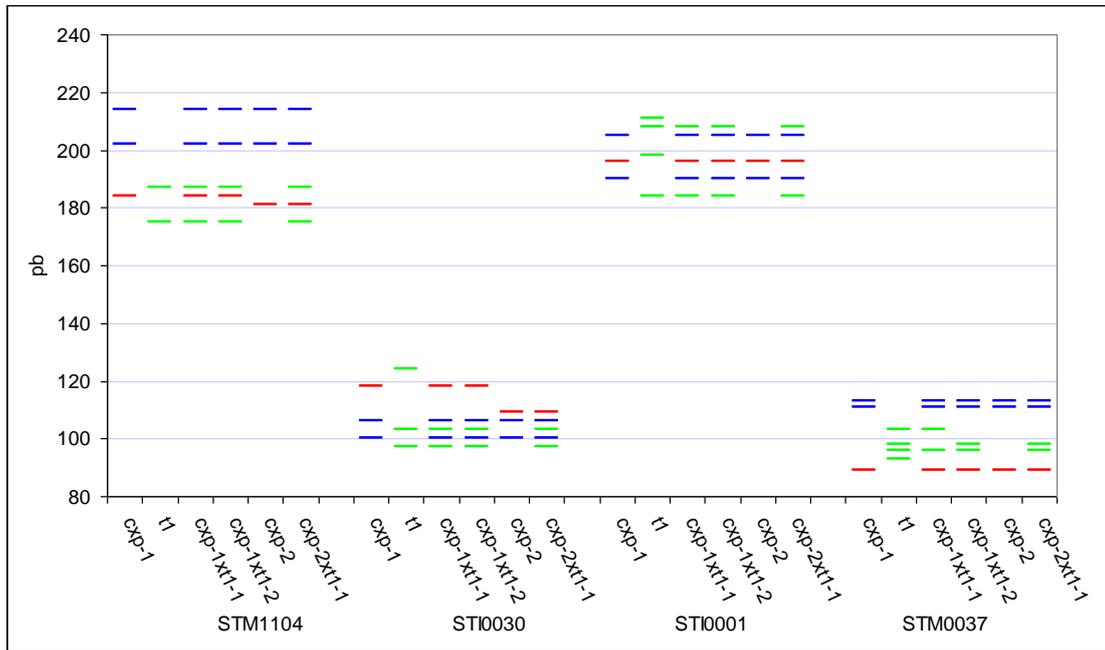


Figura 9, Composición genética de los pentaploides *cxp-1xt1-1*, *cxp-1xt1-2* y *cxp-2xt1-1* para cuatro cebadores. Para cada cebador, las primeras dos columnas muestran la constitución genética de los parentales (*cxp-1*, *cxp-2* y *t1*) y de los cuatro híbridos pentaploides. En color azul se representan los alelos de *cmm*, en rojo los alelos de *phu* y en verde los alelos de *tbr*.

A partir de la Figura 9 se realiza el esquema de la Figura 10, donde se muestra en forma resumida el aporte de material genético de cada parental.

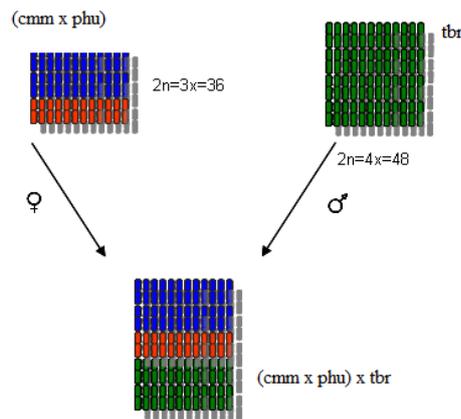


Figura 10, Representación esquemática de un cruzamiento entre un triploide (*cmm x phu*) y *tbr*. Se muestra que el parental femenino (3X) trasmite toda su heterocigosis, mientras que el parental masculino (*tbr*), aporta la mitad de sus genes.

Por otra parte, en la Tabla 4 se muestra la heterocigosis de los distintos loci en *tbr1*, además de indicar los loci del pentaploide *cxp-1xt1-1*, *cxp-1xtbr1-2* y *cxp-2xtbr1-1* respectivamente, para los cuales éstos heredan la constitución genética inalterada de su parental triploide. Es importante señalar, que los pentaploides reciben diferentes alelos de *tbr1*, como se

indica en la Tabla 4. De ahí que en 17 loci estudiados, en 11 de ellos se heredan diferentes alelos de tbr1.

Tabla 4. Presencia de alelos de los parentales triploides y tbr1 en los pentaploides.

Cebador	Cromosoma	<sup>a</sup> tbr1	<sup>cxp</sup> -1xt1-1 <sup>b</sup>	<sup>cxp</sup> -1xt1-2 <sup>c</sup>	<sup>cxp</sup> -2xt1-1 <sup>d</sup>	Segregación de diferentes alelos de tbr1 <sup>e</sup>
STM0037	11	X	X	X	X	X
STI0030	12	X	X	X	X	
STM1104	8		X	X	X	
STI0033	7	X	X	X	X	X
STPoAc58	5	X	X	X	X	X
STM0019a,b	6	X	X	X	X	X
STI0001	4	X	X	X	X	
STM0031	7	X	X	X	X	X
STI0026	4	X	X	X	X	X
STI0014	9		X	X	X	
STM2028	12	X	X	X	X	
STG0025	10	X	X	X	X	X
STI0012	4	X	X	X	X	X
STI0003	8	X	X	X	X	
STG0016	1	X	X	X	X	X
STI0009	1	X	X	X	X	X
STM0003	12	X	X	X	X	X

a. Loci en que el parental tbr es heterocigoto.

b., c. y d. Loci para los cuales el híbrido recibe toda la constitución genética inalterada del parental triploide.

e. Loci en los cuales se observó la presencia de diferentes alelos de tbr en el híbrido.

A partir de los datos que se presentan en la Tabla 4 se deduce el porcentaje de la heterocigosis presente en el parental triploide que se transmitió a los pentaploides. En los 17 loci analizados en este caso, se observa que los pentaploides recibieron toda la constitución genética de su parental triploides, que es lo mismo a recibir toda la heterocigosis de cmm (ambos alelos) que ya estaba presente en el parental triploide, es decir el 100%, y a la mitad del material genético de phu (un alelo), esto es un alelo cada híbrido para cada locus. Por otra parte, el material genético de tbr1, se transmite normalmente en un 50%, ya que se observan dos alelos de este parental en cada pentaploide.

## Retrocruzas

En la tercera etapa del programa de mejoramiento, se obtienen dos grupos de híbridos, el primero corresponde al cruzamiento  $cxp-1xt1-1 \times t2$ . El segundo grupo está constituido por la progenie del cruzamiento  $cxp-1xt1-2 \times t2$ . Los genotipos de estos materiales para dos loci se representan gráficamente en la Figura 11. En cada uno de los individuos se observa la segregación de los alelos aportados por el progenitor pentaploide y el tetraploide  $t2$ . Los dos alelos de *cmm* presentes en el parental pentaploide, generalmente segregan en este cruzamiento.

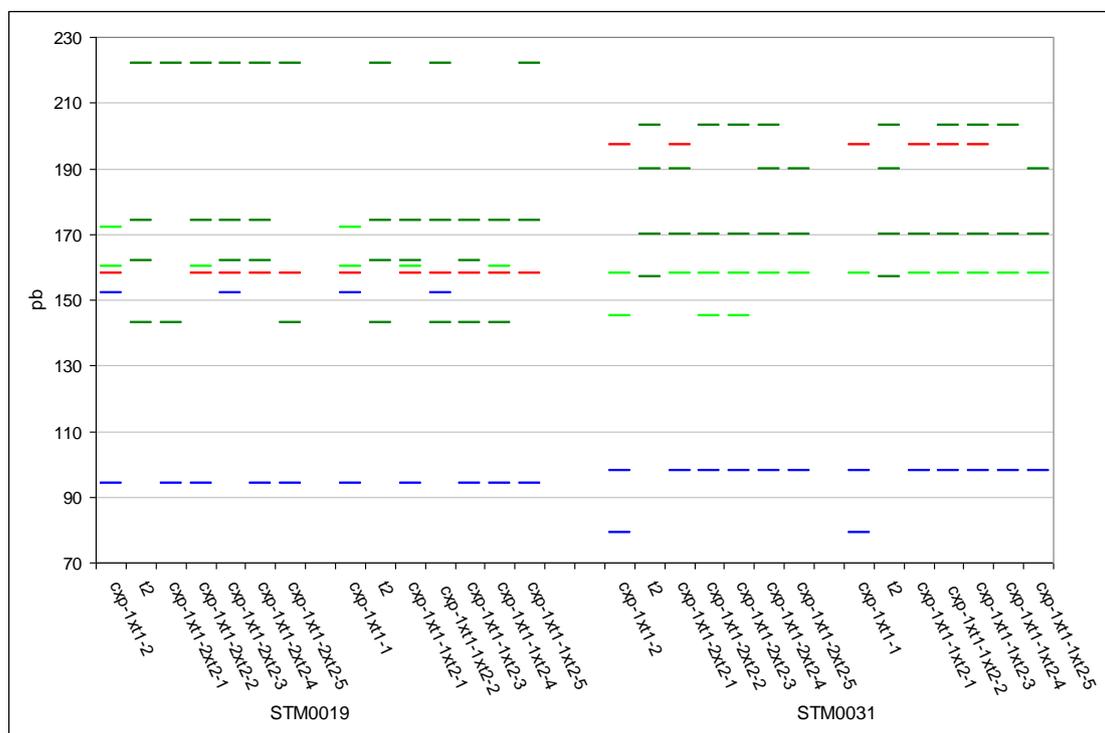


Figura 11, Composición genética de los híbridos  $cxp-2xt1-1xt2$ ,  $cxp-2xt1-2xt2$  y sus parentales para dos cebadores. En las primeras dos columnas de cada grupo de individuos, se muestra la constitución genética de los parentales y de los respectivos híbridos del cruzamiento. Para cada cebador se representan en primer lugar los híbridos  $cxp-2xt1-2 \times t2$  y a continuación  $cxp-2xt1-1 \times t2$ . En color azul se representan los alelos de *cmm*, en rojo los alelos de *phu*, en verde claro los alelos de *tbr1* y en verde oscuro los alelos de *tbr2*.

Los dos grupos de híbridos presentan en todos los casos un alelo de *cmm*, confirmando la introgresión de germoplasma de esta especie. En cambio, los alelos de *phu* aparecen en algunos de estos híbridos, mientras que en otros loci ya no se observa una contribución genética de este parental. Por otro lado, en la mayoría de los individuos aparecen alelos de *tbr1*, incluso en algunos casos se observan los dos alelos de *tbr1*, transmitidos por su parental pentaploide. Por su parte, los alelos de *tbr2* siempre están presentes en los híbridos, encontrándose prácticamente en todos los híbridos dos alelos de este parental.

Tabla 5. Representación de los híbridos de la retrocruza que presentan un alelo de phu

Cebador	Cromosoma	cxp- 1xt1-1xt2-1 a	cxp- 1xt1-1xt2-2 b	cxp- 1xt1-1xt2-3 c	cxp- 1xt1-1xt2-4 d	cxp- 1xt1-1xt2-5 e	cxp- 1xt1-2xt2-1 f	cxp- 1xt1-2xt2-2 g	cxp -1xt1-2xt2- 3 h	cxp -1xt1-2xt2- 4 i	cxp -1xt1-2xt2- 5 j	Frecuenci a <sup>k</sup>
STG0016	1		X	X				X	X	X		5/10
STM5114	2				X	X				X		3/10
STG0033	2		X	X			X	X	X	X	X	7/10
STI0026	4			X		X			X			3/10
STI0012	4		X	X			X	X				4/10
STM0019	6	X	X	X	X	X		X	X	X	X	9/10
STM1019	6			X						X	X	3/10
STI0033	7	X	X			X		X				4/10
STM0031	7	X	X	X			X					4/10
STI0003	8		X							X	X	3/10
STM1106	10					X			X	X		3/10
STI0030	12									X	X	2/10
STM0003	12	X	X	X	X	X			X	X		7/10
STM2028	12	X	X		X	X	X	X			X	7/10

a., b., c., d., e., f., g., h., i. y j. Loci para los cuales el híbrido muestra un alelo de phu. Se resaltan con color amarillo los casos donde un individuo recibe dos alelos de phu.

k. Frecuencias con que aparecen los alelos de phu en los híbridos

Tabla 6. Representación de los alelos recibidos de cmm para los diferentes loci en los híbridos de la retrocruza.

Cebador	Cromosoma	cxp-1xt1- a	cxp-1xt1- 2 <sup>b</sup>	cxp-1xt1- 1xt2-1 <sup>c</sup>	cxp-1xt1- 1xt2-2 <sup>d</sup>	cxp-1xt1- 1xt2-3 <sup>e</sup>	cxp-1xt1- 1xt2-4 <sup>f</sup>	cxp-1xt1- 1xt2-5 <sup>g</sup>	Frecuencia <sup>h</sup>	cxp-1xt1- 2xt2-1 <sup>i</sup>	cxp-1xt1- 2xt2-2 <sup>j</sup>	cxp-1xt1- 2xt2-3 <sup>k</sup>	cxp-1xt1- 2xt2-4 <sup>l</sup>	cxp- 1x	Frecuencia <sup>n</sup>
STG0016	1	104/113	104/113	113	104	104	113	104	3/2	104	104	104	104	104	5/0
STI0009	1	193/199	193/199	199	199	193	199	199	1/4	199	199	199	199	199	0/5
STI0026	4	198/222	198/222	222	222	198	222	222	1/4	198	198	222	198	198	4/1
STPoAc58	5	141/147	141/147	147	147	147	147	147	0/5	147	147	141	147	147	1/4
STM0019	6	94/152	94/152	94	152	94	94	94	4/1	94	94	152	94	94	4/1
STM1019	6	216/222	216/222	216	222	222	216	216	3/2	222	222	222	222	216	1/4
STI0033	7	100/133	100/133	100	100	100	100	100	5/0	100	100	100	100	100	5/0
STM0031	7	79/98	79/98	98	98	98	98	98	0/5	98	98	98	98	98	0/5
STM1104	8	202/214	202/214	202	214	214	214	202	2/3	202	214	214	202	214	2/3
STI0003	8	148/160	148/160	160	160	160	160	160	0/5	160	160	160	160	160	0/5
STM1106	10	155/164	155/164	164	164	164	164	164	0/5	164	164	155	164	164	1/4
STM0037	11	111/113	111/113	113	113	113	113	113	0/5	111	113	111	113	113	2/3
STI0030	12	100/106	100/106	100	100	100	100	100	5/0	100	100	100	100	100	5/0
STM0003	12	146/154	146/154	154	154	154	154	154	0/5	154	154	154	154	154	0/5

a. y b. Alelos de cmm presentes en los parentales triploides para los diferentes loci

c., d., e., f., g., i., j., k., l. y m. Alelo de cmm heredado por los híbridos RC a partir de su respectivo parental triploide.

h. y n. Frecuencia con que aparecen los alelos de cmm en los híbridos

Se puede observar en la Tabla 5 los híbridos que recibieron un alelo de phu. Para esto, se utilizaron cebadores que no presentaron solapamiento entre bandas de phu y otras especies. Aquí se evidencia la segregación de 14 loci en 10 individuos, y se observa que en 62 de los 140 casos dados por los diferentes loci en los individuos, los híbridos presentan un alelo de phu, o sea un 44% recibió germoplasma de phu. En los casos donde es posible interpretar sin ambigüedad dos o tres loci por cromosoma, se destaca que en 50 casos estudiados, 6 de ellos recibieron el material genético de los dos loci de un mismo cromosoma (marcado en amarillo en Tabla 5). Es decir, un 12% de los individuos recibió dos marcadores de un cromosoma de phu.

Por otro lado, en la Tabla 6 se observa que todos los híbridos de la retrocruza recibieron un solo alelo de cmm. Debido al bajo número de individuos estudiados, no es pertinente determinar si los alelos heredados por estos híbridos se ajustan a una segregación aleatoria, pero las proporciones observadas son congruentes con una segregación normal, ya que en las columnas de las frecuencias observamos, en la mayoría de los casos, que los diferentes individuos recibieron alelos diferentes de cmm.

## Discusión

### ***Introgresión de cromatina de *S.commersonii* en el germoplasma de papa***

Los microsatélites resultaron una herramienta apropiada para este tipo de estudio, ya que permitieron realizar un análisis molecular de gran alcance, logrando abarcar todos los objetivos planteados. Se logró encontrar varios alelos por locus y diferenciar en un mismo individuo alelos de especies parentales diferentes. De este modo, fue posible evidenciar la introgresión de germoplasma de *cmm* en las retrocruzas a través de la presencia de dichos marcadores. Debido al alto grado de heterocigosis detectado que permite observar los patrones de segregación de cromosomas homólogos, fue posible obtener información sobre los mecanismos de producción de gametos no reducidos y la forma de apareamiento de los cromosomas.

En este estudio, se encontraron marcadores de *cmm* en todos los pasos del programa (ver Tablas 3, 4 y 6). Esto permite confirmar que los cruzamientos fueron realizados con éxito, y que se cumplió el objetivo de introgresión de material de *cmm*.

Por otro lado, la información sobre las características fenotípicas de las plantas en todas las etapas del programa de mejoramiento, proporcionada por González (2010), es congruente con las contribuciones genéticas observadas en este trabajo. En la morfología de los triploides se encontraron rasgos de *cmm* y *phu*, consistentemente con la presencia de alelos de ambos parentales en el genotipo de los triploides. Lo mismo ocurre con los híbridos pentaploides, en que se observan además características fenotípicas y genotípicas de *tbr* (González 2010) al igual que la resistencia a la marchitez bacteriana y la buena tuberización de los híbridos de la RC2.

### ***Constitución genética y formación de los triploides***

#### **Modo de producción de los gametos no reducidos**

En cuanto al segundo objetivo de este trabajo, en que se intenta determinar el modo de producción de los gametos no reducidos, los genotipos de los individuos obtenidos en los dos primeros pasos del esquema de introgresión fueron particularmente informativos. Cabe destacar que la producción de gametos femeninos  $2n$  por *cmm* fue reportado por Masuelli *et al.* (1992) y Carputo *et al.* (1997). El patrón de herencia de la heterocigosis sugiere que los gametos no reducidos son producidos mediante Restitución en la Primera División. Como se aprecia en la Figura 1, este tipo de mecanismo de producción de gametos  $2n$  da lugar a gametos con dos

cromosomas homólogos, lo que resulta en la presencia de dos alelos (bandas) de cada locus en los análisis con microsatélites para loci heterocigotas en el individuo parental. Para los casos de los triploides cxp-1 y cxp-2, y de los pentaploides cxp-1xt1-1, cxp-1xt1-2 y cxp-2xt1, el genoma de cmm se transmitió en un 100% observándose dos alelos, que corresponden cada uno a un cromosoma homólogo. Esto pudo observarse en todos los loci presentados en la Tabla 3.

Sin embargo autores como Carputo (2000), indican que los mecanismos tipo RSD son más frecuentes en la megasporogénesis, de acuerdo con lo cual debería esperarse un alto grado de homocigosis para los alelos de cmm en la progenie producida por gametos  $2n$ . La presencia de dos alelos de cmm en los triploides y pentaploides, también puede producirse en algunos casos como consecuencia de la recombinación homóloga en la producción de gametos  $2n$  por RSD. A pesar de esto, debido a que se trabajó con varios loci y en algunos casos con dos loci por cromosoma, y en todos los casos se observa la presencia de los dos alelos de cmm en los triploides y pentaploides, este mecanismo resulta poco probable. Por otra parte, de acuerdo con Barone *et al.* (1995), se espera que los gametos  $2n$  producidos por RPD transfieren el 80% de la heterocigosis del parental, mientras que en la RSD sólo se espera la transmisión del 40% de la heterocigosis parental. La transmisión del 100% de la heterocigosis en este caso, sugiere la posible intervención de algún mecanismo adicional como la supresión del entrecruzamiento (Werner 1991), de esta forma el gameto se produce como si la meiosis hubiera sido omitida.

### **Cromosomas de phu en los triploides**

La especie *S. phureja* aporta un 50% de sus alelos a los híbridos triploides. Esto es debido a que los gametos reducidos de phu llevaran consigo un alelo de cada locus, elegido al azar para conformar el gameto y luego al triploide. En las Tablas 3 y 5 se aprecia que los triploides heredan casi en un 50% de los loci alelos diferentes de phu, de acuerdo con la segregación normal esperada de los mismos.

### ***Constitución genética de los pentaploides***

Los tres individuos pentaploides estudiados recibieron todo el genotipo y por lo tanto, toda la heterocigosis de su respectivo parental triploide y consiguientemente del individuo de cmm utilizado en el primer paso del programa. Además, heredaron la mitad de los alelos de tbr1. El aporte de la constitución genética completa por parte del parental triploides, sugiere que éstos producen gametos  $2n$ . La presencia de gametos femeninos  $2n$  en los híbridos  $3x$  concuerda con las observaciones de Masuelli *et al.* (1992) y Carputo *et al.* (1997), donde encontraron que los triploides producían gametos  $2n$  tanto femeninos como masculinos. En cuanto al parental tbr, se observa en la Tabla 4 el aporte de dos alelos por cada locus, lo que sugiere que tbr1 produce gametos reducidos normales. Esto es así debido a que en la

mayoría de los loci estudiados (5/8), se observa la presencia de diferentes alelos de *tbr1* en los tres pentaploides.

Los pentaploides obtenidos a partir de un mismo individuo de *S. commersonii* original al comienzo del programa son equivalentes desde el punto de vista de su contribución a la introgresión de germoplasma de la especie silvestre. Esto es debido a que por la forma de producción de gametos  $2n$  se obtuvieron gametos genéticamente idénticos para todos los loci analizados, por lo que los híbridos recibirán siempre la misma información genética. En consecuencia, la introgresión de mayor diversidad debe basarse en la producción de diferentes puentes triploides a partir de diferentes individuos de *S. commersonii*. Por otro lado, las diferencias fenotípicas y genotípicas entre los diferentes pentaploides producidos a partir de un mismo individuo de *S. commersonii* deben explicarse mayormente por la interacción entre los genes de las tres especies y la presencia de alelos diferentes de *S. phureja* y de *S. tuberosum*. Esto ocurre debido a que en la formación de los gametos de estas últimas especies se observó la segregación de sus alelos, aportando cada uno de ellos diferente información genética.

### ***Constitución genética de los híbridos de la retrocruza***

#### **Mecanismo de apareamiento cromosómico en los híbridos**

No se encontró evidencia de recombinación entre los cromosomas de *cmm* y *tbr* a diferencia de lo reportado en la literatura. Los híbridos producidos en la retrocruza entre los pentaploides y *tbr2* presentan en todos de los casos un solo alelo de *cmm*, como se aprecia en la Tabla 6. Esto puede darse por causa de un apareamiento preferencial, lo que significa que los cromosomas de *cmm* se aparean preferencialmente con su homólogo de *cmm* antes que con sus homeólogos de *phu* y *tbr*. Los dos cromosomas de *cmm* apareados segregan a diferentes gametos, como se observa en la Figura 3, lo que resulta en que cada híbrido descendiente presente un solo alelo de *cmm*. En segundo lugar, puede ser debido a un apareamiento no preferencial enmascarado por procesos de recombinación. En la Figura 3 se muestra la formación de gametos mediante este mecanismo, el que también dará lugar a híbridos con un solo alelo de *cmm*. Un apareamiento no preferencial se produce cuando los cromosomas de *cmm* no son suficientemente diferenciados a los de *tbr*, por lo que puede resultar en un apareamiento entre cromosomas de *cmm* y *tbr*. Este mecanismo fue observado por Barone *et al.* (1999, 2011). En estos trabajos se encontró evidencia de que los cromosomas de *cmm* se recombinaban con los de *tbr*, a través del análisis de marcadores moleculares en híbridos interespecíficos. En este estudio, por el contrario se encontró en todos los individuos analizados un solo alelo de *cmm* para cada locus (ver Tabla 6), por lo que se sugiere que los cromosomas se aparean preferencialmente.

## **Contribución genética de phu en la retrocruza**

En esta generación, la contribución genética de phu comienza a disminuir. En la Tabla 5 se observa que sólo un 44% de los marcadores de phu estudiados fueron heredados por un híbrido de la retrocruza. Otro punto a destacar es que de 50 casos donde se tienen dos marcadores por cromosoma, solamente en 6 de ellos ambos marcadores de un mismo cromosoma de phu están presentes en un mismo individuo. Esto sugiere que en una proporción muy baja de los casos se trasmite un cromosoma completo de phu, si bien, al igual que en los casos anteriores, se pueden dar procesos de recombinación que enmascaran la presencia de un cromosoma recombinado de phu en un híbrido. De esta forma se puede concluir que en la mayoría de los casos estudiados los cromosomas de phu sufrieron procesos de recombinación. En base al comportamiento observado para los marcadores de cmm, se sugiere que esta recombinación se da principalmente con cromosomas de papa, ya que los cromosomas de cmm tienden a aparearse con su homólogo consistentemente con la mayor cercanía filogenética entre phu y tbr.

## **Selección asistida por marcadores**

González (2010), señala que los híbridos de la retrocruza presentan buena tuberización, alta resistencia bacteriana, y marcada semejanza al parental silvestre. Estas características fenotípicas concuerdan con las genotípicas, ya que en los análisis moleculares realizados en diez de estos híbridos se encontraron marcadores de tbr y cmm. Los marcadores de tbr muestran que en los híbridos hay germoplasma de papa. En esta etapa no es posible asociar los genes con efecto conocido con los marcadores utilizados.

En términos generales, cuantos más marcadores de papa estén presentes en los híbridos, se espera un mejor comportamiento agronómico. Del mismo modo, cuanto más marcadores cmm se encuentran en un híbrido, hay más posibilidad de que éste presente resistencia a bacterias y a condiciones desfavorables transmitidas del progenitor silvestre. Pero también, este individuo presentará características negativas de la especie silvestre, ya que aumentará la presencia de genes no deseados. Por consiguiente, el objetivo del programa consiste en llegar a un híbrido que presente muchos marcadores de tbr, y sólo un número reducido de marcadores de cmm asociados a las resistencias que se desea introgresar.

De acuerdo a lo observado y a los mecanismos propuestos, la magnitud de la contribución genética del parental silvestre es equivalente en todos los individuos de la RC. Por lo tanto, recién se comenzarán a encontrar diferencias en la magnitud dicha contribución en la siguiente retrocruza.

## Conclusiones

Los marcadores moleculares confirmaron la introgresión de germoplasma de *S. commersonii* en el programa de mejoramiento.

El mecanismo citológico de producción de gametos no reducidos observado mediante marcadores moleculares se aproxima más a un mecanismo genéticamente equivalente a la formación de núcleos de Restitución en Primera División (RPD), pero no se descarta estar frente a un fenómeno de supresión del entrecruzamiento.

Los distintos híbridos pentaploides obtenidos a partir de un mismo individuo de *S. commersonii*, son equivalentes desde el punto de vista de su contribución a la introgresión de germoplasma de la especie silvestre. Es por esto que la introgresión de mayor diversidad debe basarse en la producción de diferentes puentes triploides a partir de diferentes individuos de *S. commersonii*.

El apareamiento entre los cromosomas de *cmm* es preferencial, en consecuencia, el programa producirá híbridos con contribuciones de la especie silvestre de diferente magnitud a partir de la segunda retrocruza.

En la selección de individuos a partir de la RC2, se puede acelerar el proceso de eliminación de germoplasma silvestre en los materiales utilizando estos marcadores.

## Bibliografía

- Alarcón, D. 2000. Hibridación natural entre laurel (*Laurelia sempervirens*) y tepa (*Laureliopsis philippiana*). Tesis.
- Barbará, T.; Palma-Silva, G.; Paggi, F.; Bered, M.; Fay, M.; Lexer, C. 2007. Crossspecies transfer of nuclear microsatellite markers: potentials and limitations. *Mol. Ecol.* 16: 3759-3767.
- Barone, A.; Gebhardt, C.; Frusciante, L. 1995. Heterozygosity in 2n gametes of potato evaluated by RFLP markers. *Theoretical and Applied Genetics.* 91:98-104.
- Barone, A.; Sebastiano, A.; Carputo, D. 1999. Chromosome pairing in *Solanum commersonii*-*Solanum tuberosum* sexual hybrids detected by commersonii-specific RAPDs and cytological analysis. *Genome* 42: 218-224
- Barone, A.; Sebastiano, A.; Carputo, D.; Rocca, F.; Frusciante, L. 2001. Molecular marker-assisted introgression of the wild *Solanum commersonii* genome into the cultivated *S. tuberosum* gene pool. *Theor Appl Genet* (2001) 102:900–907.
- Becerra, V.; Paredes C. 2000. Uso de marcadores bioquímicos y moleculares en estudios de diversidad genética. *Agricultura. Técnica.* Vol.60, n.3 pp. 270-281. [http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0365-28072000000300007&lng=es&nrm=iso](http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0365-28072000000300007&lng=es&nrm=iso). ISSN 0365-2807. doi: 10.4067/S0365-28072000000300007
- Bielig, L.; Mariani, A.; Berding, N. 2003. Cytological studies of 2n male gamete formation in sugarcane, *Saccharum L.* *Euphytica* 133: 117–124.
- Bonamico, N. (2004). Caracterización y clasificación de híbridos simples de Maíz con marcadores SSR1. INTA Argentina.
- Bradshaw, J. 2007. Potato-Breeding Strategy. In: *Potato biology and biotechnology. Advances and perspectives.* Vteugdenhil D (eds). Amsterdam, The Netherlands. Elsevier. Pp 157-177.
- Camadro, E.L. 1996. Especies Silvestres y Mejoramiento Genético de la Papa. *Ciencia Hoy.* Vol. 5 - N°35. <http://www.cienciahoy.org.ar/hoy35/papa01.htm>
- Carputo, D.; Cardi, T.; Frusciante, L.; Peloquin, S. 1995. Male fertility and cytology of triploid hybrids between tetraploid *Solanum commersonii* (2n = 4x = 48, 2EBN) and *Phureja-Tuberosum* haploid hybrids (2n = 2x = 24, 2EBN). *Euphytica* 83: 123-129.

- Carputo, D.; Barone, A.; Cardi, t.; Sebastiano, A.; Frusciant, L.; Peloquin, S 1997. Endosperm balance number manipulation for direct in vivo germplasm introgression to potato from a sexually isolated relative (*Solanum commersonii* Dun.). *Genetics* Vol. 94, pp. 12013–12017.
- Carputo, D.; Barone, A.; Fruciant, L. 2000. 2n gametes in the potato: essential ingredients for breeding and germoplams tranfer. *Teorcal and Applied Genetics*. 101: 805-813.
- Carputo, D.; Castaldi, L.; Caruso, I.; Aversano, R.; Monti, L.; Frusciant, L. 2007. Resistance to frost and tuber soft rot in near-pentaploid *Solanum tuberosum*-*S. Commersonii* hybrids. *Breeding Science*. 57: 145-151.
- Castillo, R.; Spooner, D. 1997. Phylogenetic relationships of wild potatoes, *Solanum* series *Conicibaccata* (Sect. *Petota*). *Systematic Botany* 22(1): 45-83.
- Contreras, A. 2008. Uso de especies silvestres y cultivadas en el mejoramiento de la papa. *Agro sur* 36(3): 115-129.
- den Nijs, T.; Peloquin, S. 1977. 2n gametes in potato species and their function in sexual polyploidization. *Euphytica* 26: 585-600.
- Donoso, C. Zegers. 2004. Variación intraespecífica en especies arbóreas de los bosques templados de Chile y Argentina. pp 49.
- [http://books.google.com/books?id=7GmAbzVWtdcC&pg=PA49&dq=hibridacion+inter+especifica&hl=es&ei=XhJxTef5GMSBIAfM5Z3ADw&sa=X&oi=book\\_result&ct=result&resnum=1&ved=0CCcQ6AEwADgK#v=onepage&q&f=false](http://books.google.com/books?id=7GmAbzVWtdcC&pg=PA49&dq=hibridacion+inter+especifica&hl=es&ei=XhJxTef5GMSBIAfM5Z3ADw&sa=X&oi=book_result&ct=result&resnum=1&ved=0CCcQ6AEwADgK#v=onepage&q&f=false)
- Echenique, V.; Rubinstein, C.; Mroginski, L. 2004. Biotecnología y Mejoramiento Vegetal I. Parte II, Capitulo 4. Marcadores Moleculares. <http://www.inta.gov.ar/ediciones/2004/biotec/biotec.htm>
- Echt, C.; May-Marquardt, P.; Hseih, M.; Zahorchak, R. 1996. Characterisation of microsatellite markers in eastern white pine. *Genome* 39: 1102-1108.
- Ehlfred, M.; Hanneman, R.1988. The tranfer of the synaptic gene (*sy-2*) from 1EBN *Solanum commersonii* Dun. to 2EBN germoplasm. *Euphytica* 37: 181-187.
- FAO 2008, Año internacional de la Papa. <http://www.potato2008.org/es/lapapa/index.html>
- FAO 2009, Año internacional de la Papa. <http://www.fao.org/docrep/011/i0500s/i0500s00.htm>
- French, E.; De Lindo L. 1982. Resistente to *Pseudomonas solaneacearum* in Potato: Specificity and Temperatura Sensiviility. *Phytopatology* 72: 1408-1412.

- Galván, G.; Fraguas, F.; Quirici, L.; Santos, C.; Silvera, E.; Siri, M.; Villanueva, P.; Raudiviniche, L.; González, M.; Torres, D.; Castillo, A.; Dalla Rizza, M.; Vilaró, F.; Gepp, V.; Ferreira, F.; Pianzola, M.J. 2006. *Solanum Commersonii*: una especie con gran potencial para el mejoramiento genético de papa por resistencia a *Ralstonia Solanacearum*. In: Avances de investigación en recursos genéticos en el cono sur II. Procisur, IICA. Uruguay. pp 87-102.
- Garrido, M.; Linares, A.; Vivas, J.; Segura, M.; Orjuela, A.; 2007. Búsqueda, identificación, compilación y estructuración de la información de tres especies de uso agrícola: algodón (*Gossypium hirsutum* L.), maíz (*Zea mays* L.) y papa (*Solanum tuberosum* L.) y de sus parientes silvestres para la evaluación de riesgo por introducción, uso o liberación al ambiente de organismos vivos modificados. Instituto de investigación de recursos biológicos Alexander Von Humboldt Bogotá d.c. Colombia.
- Ghislain, M.; Nuñez, J.; Herrera, M.; Pignataro, J.; Guzman, F.; Bonierbale, M.; Spooner, D. 2009. Robust and highly informative microsatellite-based genetic identity kit for potato. *Mol Breeding* 23: 377–388
- González, M. 2010. La resistencia a la marchitez bacteriana de *Solanum Commersonii* Dun. y su utilización en el mejoramiento genético de papa. Tesis.
- Hawkes, J. 1994. Origin of the cultivated potato and species relationship. In: *Potato Genetics*. Bradshaw J; Mackay G; Wallingford, UK. CAB International. pp 3-42.
- Hermesen, J. 1994. Introgression of genes from wild species, including molecular and cellular approaches. In: *Potato Genetics*. Bradshaw J. y Mackay G. ed. Wallingford U. CAB International. pp 515-538.
- Herrera, J. 2007. La citogenética molecular y su aplicación en el estudio de los genomas vegetales. *Agron. colomb.* vol.25 no.1 Bogotá Jan./June. [http://www.scielo.unal.edu.co/scielo.php?pid=S012099652007000100004&script=sci\\_arttext&tlng=es](http://www.scielo.unal.edu.co/scielo.php?pid=S012099652007000100004&script=sci_arttext&tlng=es)
- Hilje, I. 2008. Diversidad genética del árbol *Annona purpurea* Moc. & Sessé ex Dunal (Annonaceae) utilizando microsatélites como marcadores moleculares. Tesis.
- Huaman, Z.; Spooner D. 2002. Reclassification of landrace populations of cultivated potatoes (*Solanum* sect. *petota*) *American Journal of Botany* 89(6): 947–965.
- Janse, J.; Van den Beld, H.; Elphinstone, J.; Simpkins, S.; Tjou-Tam-Sin, N.; Van Vaerenbergh, J. 2004. Introduction to Europe of *Ralstonia solanacearum* Biovar 2, Race 3 in *Pelargonium zonale* cuttings. *J. of Plant Pathology* 86(2): 147-155.
- Johnston, S.; Den Nijs, T.; Peloquin, S.; Hanneman, R. 1980. The significance of genic balance to endosperm development in interspecific crosses. *Theoretical and Applied Genetics* 57: 5-9.

- Levitus, G.; Echenique, V.; Rubinstein, C.; Hopp, E.; Mroginski, L. 2008. Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II. Parte II, Capítulo 4. Herramientas Básicas de Ingeniería Genética. Pp 47-69. <http://ibone.unne.edu.ar/novedades/biotecnologia.pdf>
- Lorenz, E.; Frees, K.; Schwartz, D. 2001. M13 Tailed Primers Improve the Readability and Usability of Microsatellite Analyses Performed with Two Different AlleleSizing Methods. *BioTechniques* 31: 24-26.
- Lowry, D.; Modliszewski, J.; Wright, K.; Wu, A.; Willis, J. 2008. The strength and genetic basis of reproductive isolating barriers in flowering plants. *Phil. Trans. R. Soc. B.* 363: 3009–3021.
- Massuelli, R.; Camadro, E.; Mendiuru, A. 1992. 2n gametes in *Solanum commersonii* and cytological mechanisms of triplandroid formation in triploid hybrids of *Solanum commersonii* x *Solanum gourlayi*. *Genome.* 35: 864-869.
- Mathias, M.; Sagredo B.; Kalazich J. 2007. Uso de marcadores ssr para identificación de germoplasma de papa en el programa de mejoramiento de INIA de Chile. *Agricultura técnica (chile)* 67(1): 3-15.
- MGAP-DIEA. 2002. Caracterización de la producción de papa- Encuesta 2002. <http://www.mgap.gub.uy/Diea/Encuestas/default.htm>. Accedido 2007
- Novy, R.; Hanneman, R.. 1991. Hybridization between Gp. *Tuberosum* haploids and IEBN wild potato species. *Am. Potato J.* 68: 151-169.
- OECD. 1997. Consensus document on the biology of *Solanum tuberosum* subsp. *Tuberosum* (Potato). Series on harmonization of regulatory oversight in biotechnology. No. 8. Environment directorate. Paris. pp 38.
- Oliveira, L.; Chamma, L.; Brasil, C.; Alonso, A.; Césio, C. 2007. Pollen viability and meiotic analysis of *Solanum commersonii* Dun., *Solanum commersonii* Bitt. and *Solanum tuberosum* L. *Crop Breeding and Applied Biotechnology* 7: 387-393.
- Olmos, S. 2004. Selección asistida por marcadores moleculares y su aplicación en el mejoramiento genético de trigo. *Agrotecnia* 12: 23-31.
- Rieseberg, L.; Willis, J. 2007. Plant Speciation. *Science* 317: 910- 914.
- Roman, M.; Alonso, M.; Barrios, A. 2000. Marcadores de la variabilidad genética en el género *Musa*. FAO 2000. <http://www.fao.org/docs/eims/upload/cuba/1047/cuf0103s.pdf>
- Sourdille, P.; Tavaud, M.; Charvet, G.; Bernard, M. 2001. Transferability of wheat microsatellites to diploid Triticeae species carrying the A, B and D genomes. *Theor Appl Genet* 103: 346–352.
- Spooner, D.; Herrerscheid, W.; Van den Berg, R.; Brandenburg, W. 2003. Plant nomenclature and taxonomy: An horticultural and agronomic perspective. *Horticultural Reviews* 28: 1-60.

- Torres, A.; Boca, B. 1995. Reacción de la cadena de la polimerasa. Elementos. No 23, Vol. 3 pp 16-21.
- Vilaró, F. Disponibilidad en semillas de papa. Alternativas para su abastecimiento. INIA 2008
- Wantanabe, K.; Peloquin, S. 1991. The occurrence and frequency of  $2n$  pollen in  $2x$ ,  $4x$ , and  $6x$  wild tuber-bearing *Solanum* species from Mexico, and Central and South America. Theoretical and Applied Genetics. 82: 612-626.
- Werner, J.; Peloquin, S. 1987. Frequency and mechanisms of  $2n$  egg formation in haploid *Tuberosum*-wild species  $F_1$  hybrids. Am. Potato J. 64: 641-654.
- Werner, J.; Peloquin, S. 1991. Occurrence and mechanisms of  $2n$  egg formation in  $2x$  potato. Genome, 34(6): 975-982.
- Veilleux, R. 1983. Diploid and Polyploid Gametes in Crop Plants: Mechanisms of Formation and Utilization in Plant Breeding.
- Zlesak, D.; Thill, C. 2002. Variation for  $2n$  Pollen Production and Male Fertility in Inbred *Solanum* Germplasm Resistant to *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary (US-8). Amer J of Potato Res. 79: 219-229.
- Zucchi, M.; Brondani, R.; Pinheiro, J.; Chaves, L.; Coelho, A.; Vencovsky, R. 2003. Genetic structure and gene flow in *Eugenia dysenterica* DC in the Brazilian Cerradon

# Apéndice

Tabla 1. Constitución genética de los los individuos del primer y segundo paso del esquema de mejoramiento.

Locus	Individuo	Cmm <sup>a</sup>	Phu <sup>b</sup>	Tbr1 <sup>c</sup>	Tbr2 <sup>d</sup>	cxp-1 <sup>e</sup>	cxp-2 <sup>f</sup>	cxp-1xt1-1 <sup>g</sup>	cxp-1xt1-2 <sup>h</sup>	cxp-2xt1-1 <sup>i</sup>
STM0037	Número de alelos	2	2	4	4	3	3	5	5	5
	Tamaño de los alelos	111/113	84/89	93/96/98/103	84/89/91/103	89/111/113	89/111/113	89/96/103/111/113	89/96/103/111/113	89/96/103/111/113
STI0030	Número de alelos	2	2	3	4	3	3	5	5	5
	Tamaño de los alelos	100/106	109/118	97/103/124	88/103/109/115	100/106/118	100/106/109	97/100/103/106/118	97/100/103/106/118	97/100/103/106/109
STM1104	Número de alelos	2	2	2	4	3	3	5	5	5
	Tamaño de los alelos	202/214	181/184	175/187	184/187/193/199	202/214/184	202/214/181	202/214/175/184/187	202/214/175/184/187	202/214/175/181/187
STI0033	Número de alelos	2	2	4	4	3	3	5	5	5
	Tamaño de los alelos	100/133	130/160	127/142/148/154	127/136/148/154	100/130/133	100/133/160	100/130/133/142/154	100/130/133/148/154	100/133/160/142/154
STPoAc58	Número de alelos	2	2	4	3	3	3	5	5	5
	Tamaño de los alelos	141/147	143/149	145/151/159/165	145/149/153	141/147/149	141/147/149	141/147/145/149/165	141/147/145/149/165	141/147//149/151/165
STM0019a,b	Número de alelos	2	2	4	4	3	3	5	5	5
	Tamaño de los alelos	94/152	158/184	154/156/160/172	143/162/174/222	94/152/158	94/152/158	94/152/158/160/172	94/152/158/160/172	94/152/158/160/172
STI0001	Número de alelos	2	2	3	4	3	3	5	5	5
	Tamaño de los alelos	190/205	196/199	184/208/211	196/199/205/211	190/196/205	190/196/205	190/196184//205/208	190/196184//205/208	190/196184//205/208
STM0031	Número de alelos	2	2	4	4	3	3	5	5	5
	Tamaño de los alelos	79/98	187/197	136/145/158/206	157/170/190/203	79/98/197	79/98/187	79/98/158/197/206	79/98/145/158/197	79/98/136/158/187
STI0026	Número de alelos	2	2	4	4	3	3	5	5	5
	Tamaño de los alelos	198/222	216/218	202/204/208/216	206/212/216/230	198/218/222	198/218/222	198/202/208/218/222	198/202/204/218/222	198/204/208/218/222
STI0014	Número de	2	2	2	4	3	3	5	5	5

Locus	Individuo	Cmm <sup>a</sup>	Phu <sup>b</sup>	Tbr1 <sup>c</sup>	Tbr2 <sup>d</sup>	cxp-1 <sup>e</sup>	cxp-2 <sup>f</sup>	cxp-1xt1-1 <sup>g</sup>	cxp-1xt1-2 <sup>h</sup>	cxp-2xt1-1 <sup>i</sup>
STM2028	alelos Tamaño de los	142/160	145/148	139/145	139/142/148/157	142/148/160	142/148/160	139/142/145/148/160	139/142/145/148/160	139/142/145/148/160
	alelos Número de	2	2	4	4	3	3	5	5	5
STG0025	alelos Tamaño de los	419/497	308/311	302/311/314/380	302/380/419/467	308/419/497	308/419/497	302/308/380/419/497	302/308/380/419/497	302/308/380/419/497
	alelos Número de	2	2	3	4	3	3	4	5	5
STG0012	alelos Tamaño de los	206/214	218/222	202/210/218	210/214/218/222	206/214/222	206/214/222	206/210/214/222	206/210//214/218/222	206/210/214/218/222
	alelos Número de	2	2	4	4	3	3	5	5	5
STI0012	alelos Tamaño de los	161/170	156/164	152/155/161/167	158/161/164/167	161/164/170	161/164/170	155/161/164/167/170	155/161/164/167/170	152/155/161/164//170
	alelos Número de	2	2	4	4	3	3	5	5	5
STM5114	alelos Tamaño de los	202/208	184/196	184/187/190/202	178/190/202/208	196/202/208	196/202/208	184/190/196/202/208	184/190/196/202/208	184/187/196/202/208
	alelos Número de	2	2	4	4	3	3	5	5	5
STM1106	alelos Tamaño de los	311/317	290/308	302/305/308/317	281/287/302/308	290/311/317	308/311/317	305/308/290/311/317	305/308/290/311/317	302/305/308/311/317
	alelos Número de	2	2	4	4	3	3	5	5	4
STG0033	alelos Tamaño de los	155/164	170/182	158/167/170/176	177/188/191/210	155/164/182	155/164/170	155/164/170/176/182	155/158/164/170/182	155/164/170/176
	alelos Número de	2	1	3	4	3	3	4	4	4
STI0003	alelos Tamaño de los	149/152	158	149/152/161	146/149/155/161	149/152/158	149/152/158	149/152/158/161	149/152/158/161	149/152/158/161
	alelos Número de	2	2	4	4	3	3	5	5	5
STG0016	alelos Tamaño de los	148/160	160/190	133/151/175/184	151/169/175/187	148/160/190	148/160/190	148/160/175/184/190	48/160/175/184/190	48/160/175/184/190
	alelos Número de	2	2	4	4	3	3	5	5	5
STI0009	alelos Tamaño de los	104/113	104/110	152/158/151/173	137/146/158/173	104/110/113	104/110/113	104/110/113/152/158	104/110/113/152/161	104/110/113/152/158
	alelos Número de	2	2	4	4	3	3	5	5	5
STM0003	alelos Tamaño de los	193/199	193/289	150/282/294/300	177/193/276/288	193/199/289	193/199/289	150/193/199/289/300	150/193/199/289/294	150/193/199/289/294
	alelos Número de	2	2	3	4	3	3	5	5	5
STG0021	alelos Tamaño de los	146/154	154/166	150/156/160	152/158/162/168	146/154/166	146/154/166	146/150/154/156/166	146/150/154/160/166	146/154/156/160/166
	alelos Número de	2	2	4	4	3	3	5	5	5

Locus	Individuo	Cmm <sup>a</sup>	Phu <sup>b</sup>	Tbr1 <sup>c</sup>	Tbr2 <sup>d</sup>	cxp-1 <sup>e</sup>	cxp-2 <sup>f</sup>	cxp-1xt1-1 <sup>g</sup>	cxp-1xt1-2 <sup>h</sup>	cxp-2xt1-1 <sup>i</sup>
STG0010	Tamaño de los alelos	136/140	140/148	140/152/164/176	136/148/160/176	136/140/148	136/140/148	136/140/148/164/176	136/140/148/152/164	136/140/148/152/164
	Número de alelos	2	2	3	4	3	3	4	4	4
STM1053	Tamaño de los alelos	178/184	184/186	170/182/184	180/182/184/186	178/184/186	178/184/186	170/178/184/186	170/178/184/186	178/182/184/186
	Número de alelos	2	2	3	4	3	3	4	5	4
STM1019	Tamaño de los alelos	186/192	188/192	179/188/190	183/186/188/190	186/188/192	186/188/192	186/188/190/192	179/186/188/190/192	179/186/188/192
	Número de alelos	2	2	4	3	3	3	5	5	5
	Tamaño de los alelos	216/222	216/219	222/225/249/267	309/315/321	216/219/222	216/219/222	216/219/222/225/249	216/219/222/225/267	216/219/222/249/267

a. Número y tamaño de los alelos de cmm para los diferentes loci.

b. Número y tamaño de los alelos de phu para los diferentes loci.

c. Número y tamaño de los alelos de tbr1 para los diferentes loci.

d. Número y tamaño de los alelos de tbr2 para los diferentes loci.

e. y f. Número y tamaño de los alelos presentes en los triploides para los diferentes loci.

g.,h. y i. Número y tamaño de los alelos presentes en los pentaploides para los diferentes loci.

Continúa Tabla 1

Tabla 2. Constitución genética de los los individuos del tercer paso del esquema de mejoramiento. Se muestra el número y tamaño de los alelos presentes el los híbridos de la retrocruza para los diferentes loci.

Locus	Indiv.	cxp-1xt1-1xt2-1	cxp-1xt1-1xt2-2	cxp-1xt1-1xt2-3	cxp-1xt1-1xt2-4	cxp-1xt1-1xt2-5	cxp-1xt1-2xt2-1	cxp-1xt1-2xt2-2	cxp-1xt1-2xt2-3	cxp-1xt1-2xt2-4	cxp-1xt1-2xt2-5
	Alelos										
STM0037	Número Tamaños	5 84/89/91/96/113	6 84/89/91/96/103/113	5 84/89/91/96/113	5 84/89/91/96/113	5 84/89/91/96/113	5 84/89/96/103//111	5 84/89/91/96/113	5 84/89/91/96/111	5 84/89/91/96/113	5 84/89/91/96/113
STI0030	Número Tamaños	5 88/97/100/103/115	5 88/97/100/103/109	5 88/97/100/103/115	5 88/97/100/103/115	5 88/97/100/103/115	5 88/97/100/109/115	4 88/97/100/103	4 88/97/100/103	5 97/118/100/103/115	5 97/118/100/103/115
STM1104	Número Tamaños	5 175/184/187/193/202	5 175/184/187/193/214	5 175/184/187/199/214	5 175/184/187/199/214	5 175/184/187/193/202	3 175//187/199	5 175/184/187/199/214	5 175/184/187/193/214	4 175/184/187/199	5 175/184/187/199/214
STI0033	Número Tamaños	5 100/130/136/142/154	4 100/130/136/154	4 100/127/142/154	5 100/127/136//142/154	4 100/130/142/154	4 100/127/148/154	5 100/130/136/148/154	4 100/127/148/154	4 100/136/148/154	4 100//136/148/154
STPoAc58	Número Tamaños	5 245/247/249/251/253	5 245/247/251/253/265	5 245/247/249/251/265	5 245/247/249/251/265	4 245/247/249/251	5 245/247/249/251/265	5 245/247/249/251/265	4 241/245//251/265	4 245/247/251/265	4 245/247/251/265
STM0019a,b	Número Tamaños	5 94/158/160/162/174	5 143/152/158/174/222	5 94/143/158/162/174	5 94/143/158/160/174	3 94/152/158/174/222	3 94/143/222	5 94/158/160/174/222	5 152/158/164/174/222	5 94/158/162/172/22	4 94/143/148/222
STI0001	Número Tamaños	5 184/190/196/205/211	5 184/196/199/205/211	5 184/196/199/205/211	5 184/190/196/199/205	4 184/196/199/205	5 184/196/199/205/211	5 184/196/199/205/211	5 184/196/205/208/211	5 184/196/205/208/211	5 84/196/199/205/211
STM0031	Número Tamaños	5 98/158/170/197/206	5 98/158/170/197/203	5 98/158/170/197/203	4 98/158/170//203	4 98/158/170/190	5 98/158/170/190/197	5 98/145/158/170/203	5 98/145/158/170/203	5 98/158/170/190/203	4 98/158/170/190
STI0026	Número Tamaños	5 202/204/212/222/230	5 202/204/216/222/230	5 198/212/216/218/230	5 204/212/216/222/230	5 212/216/218/222/230	5 198/202/204/212/216	5 198/204/212/216/230	4 212/216/218/222	5 198/204/212/216/230	5 198/202/212/216/230
STI0014	Número Tamaños	4 139/142/148/178	4 139/142/148/178	4 139/142/148/178	3 139/142/148	3 139/142/148	4 139/142/148/178	5 139/142/148/160/178	4 139/142/148/178	4 139/142/148/178	5 139/142/148/160/178
STM2028	Número Tamaños	4 302/308/419/497	4 302/308/419/497	4 302/380/419/497	4 302/308/380/419	4 302/308/380/419	4 308/380/419/497	4 302/308/419/497	3 302/380/497	4 302/380/419/497	5 302/308/380/419/497
STG0025	Número Tamaños	5 206/210/214/218/222	5 206/210/214/218/222	4 210/214/218/222	3 210/214/218	5 206/210/214/218/222	3 210/214/218	3 210/214/218	4 210/214/218/222	4 210/214/218/222	3 210/214/218
STG0012	Número Tamaños	4 155/158/161/164	4 155/158/161/164	4 155/158/161/167	4 155/158/161/167	4 155/158/161/167	4 155/164/167/170	5 155/158/161/164/170	4 155/158/161/167	5 155/158/164/167/170	4 155/158/161/167
STI0012	Número Tamaños	5 184/187/190/202/205	5 178/184/190/196/208	5 190/196/202/205/208	3 190/202/208	4 187/190/202/208	5 178/184/190/196/205	5 184/187/190/202/205	4 184/187/190/202	4 187/190/202/208	4 190/202/205/208
STM5114	Número Tamaños	4 281/302/305/311	4 281/302/305/311	3 302/305/311	4 287/290/302/305	3 281/305/317	3 302/308/311	5 302/305/308/311/317	3 302/311/317	4 287/302/305/311	4 290/305/311/317
STM1106	Número	4	4	5	5	5	3	5	5	4	4

Locus	Indiv. Alelos	cxp-1xt1-1xt2-1	cxp-1xt1-1xt2-2	cxp-1xt1-1xt2-3	cxp-1xt1-1xt2-4	cxp-1xt1-1xt2-5	cxp-1xt1-2xt2-1	cxp-1xt1-2xt2-2	cxp-1xt1-2xt2-3	cxp-1xt1-2xt2-4	cxp-1xt1-2xt2-5
	Tamaños	161/164/176/210	161/164/176/210	164/176/182/188/210	161/164/170/176/210	161/164/170/176/182	161/164/176	158/161/164/170/176	155/161/170/176/182	161/164/176/182	161/164/176/210
STG0033	Número	3	4	4	3	3	4	4	5	4	3
	Tamaños	149/155/161	146/152/158/161	146/152/158/161	149/155/161	149/155/161	149/155/158/161	149/152/158/161	146/149/155/158/161	149/152/158/161	149/158/161
STI0003	Número	5	5	4	4	5	3	3	3	5	5
	Tamaños	151/160/169/175/187	151/160/169/175/190	151/160/169/175	151/160/169/175	151/160/169/175/184	160/175/187	151/160/175	151/160/175	151/160/175/184/190	51/160/175/184/190
STG0016	Número	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	Tamaños	113/152/158/161/173	104/110/152/158/173	104/110/152/158/161	113/152/158/161/173	104/146/158/161/173	104/146/158/161/173	104/110/158/161/173	104/110/152/158/161	104/110/158/161/173	104/137/158/161/173
STI0009	Número	5	5	5	5	5	5	5	4	5	5
	Tamaños	177/199/276/288/300	177/199/276/288/300	177/193/199/288/300	177/199/276/288/300	177/199/276/288/300	177/199/276/288/294	177/199/276/288/294	150/199/288/300	150/177/199/276/288	150/177/199/276/288
STM0003	Número	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	Tamaños	150/154/158/166/172	150/154/158/166/172	152/154/158/166/172	152/154/158/166/172	152/154/158/166/172	154/158/160/168/172	150/154/158/168/172	154/158/160/166/168	150/154/158/160/172	150/154/158/160/172
STG0021	Número	5	5	5	5	5	4	5	4	5	5
	Tamaños	136/140/148/152/176	136/140/148/152/176	140/148/152/160/176	136/140/148/152/176	136/140/148/160/176	136/140/152/164	136/140/152/164/176	136/152/164/176	136/140/148/152/176	136/140/148/152/176
STG0010	Número	4	4	4	4	3	5	5	3	5	3
	Tamaños	178/182/184/186	178/180/184/186	178/182/184/186	178/180/184/186	178/180/184	170/178/180/184/186	170/178/182/184/186	178/180/184	170/178/180/184/186	178/184/186
STM1053	Número	4	5	4	4	4	3	5	4	4	3
	Tamaños	183/186/188/192	183/186/188/190/192	183/188/190/192	186/188/190/192	186/188/190/192	183/186/190	183/186/188/190/192	183/188/190/192	179/188/190/192	188/190/192
STM1019	Número	4	5	5	3	3	5	3	4	4	5
	Tamaños	216/225/309	222/225/249/309/315	219/222/225/249/309	216/225/309	216/225/309	222/225/267/309/315	222/225/309	222/225/267/309	219/222/225/309	216/219/225/309/315

Continúa Tabla 2