

**TESINA PARA OPTAR POR EL GRADO DE
LICENCIADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

Caracterización morfológica y molecular de parientes silvestres de papa de Uruguay

Germán Federico ABAD NJERŠ

Orientadora: Dra. Paola Gaiero

Co-Orientador: Dr. Pablo Speranza

*Laboratorio de Evolución y
Domesticación de Plantas*

Diciembre, 2019

Tesis aprobada por el tribunal:

Dr. Ing. Agr. Mauricio BONIFACINO

Msc. Ing. Agr. Pablo GONZÁLEZ-BARRIOS

Dr. Ing. Agr. Rafael VIDAL

Orientadora y Co-Orientador:

PhD. (Mag.) Lic. Paola GAIERO

PhD. Ing. Agr Pablo SPERANZA

Autor del trabajo:

Bach. Germán ABAD NJERŠ

TABLA DE CONTENIDO

PÁGINA DE APROBACIÓN	II
AGRADECIMIENTOS Y FINANCIACIÓN	IV
LISTADO DE TABLAS Y FIGURAS	V
INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVOS E HIPÓTESIS	8
MATERIALES Y MÉTODOS	9
· Material vegetal	9
· Caracterización morfológica	11
· Caracterización molecular	13
· Análisis estadístico	14
RESULTADOS	17
· Grupos morfológicos individuales	18
· Localización de los individuos triploides en los grupos morfológicos y genéticos definidos	24
DISCUSIÓN	26
CONCLUSIONES	30
RESUMEN	31
BIBLIOGRAFÍA CONSULTADA	32
ANEXOS	42

AGRADECIMIENTOS:

A mi familia, a mis padres por el sacrificio y el esfuerzo que hicieron para mi formación, por inculcarme los valores que me definen y por su apoyo incondicional, y a mi hermana, por ser mi inspiración y mi cómplice en todo.

A mis orientadores, Paola y Pablo, por recibirme y guiarme en este proceso, por la paciencia y la disposición, por formar mi carácter científico y profesional.

A Mariana Andino, por ser compañera y mentora, por enseñarme a trabajar con plantas y por todo su apoyo en todas las etapas de este trabajo.

A Francisco Vilaró y Pablo González-Barrios, por su consejo y buena disposición.

A los pasantes, docentes y ayudantes de LEDP, sin su colaboración esto no habría sido posible.

A todos los docentes y compañeros que crucé en el camino, y muy especialmente a mi adorada Mesa de Crosa, por ser mi sustento moral e intelectual, por todo el amor que transmiten y la pasión que contagian.

A Aleksandra Elbakyan, creadora de Sci-Hub, por democratizar el conocimiento y remover todas las barreras en el camino de la ciencia.

FINANCIACIÓN:

“Caracterización morfológica y molecular de parientes silvestres de papa de Uruguay” se enmarca en el proyecto CSIC I+D 2016_250 “Identificación de grupos genéticos y distribución de la variabilidad de papas silvestres para su conservación en colecciones núcleo y uso en mejoramiento genético”, Responsable Paola Gaiero.

LISTADO DE TABLAS Y FIGURAS

Nro. de tabla	Página
1. SSR utilizados en la caracterización genética	14
2. Porcentajes obtenidos en la matriz de medias ajustadas para cada estado de cada variable de la caracterización morfológica	17
Nro. de figura	Página
1. Mapa con los genotipos analizados de Uruguay por ploidía	10
2. Fotografías de la caracterización	12
3. AMC morfológico	20
4. PCoA genético	21
5. Test de correlación de Mantel	22
6. Mapa con la distribución de los genotipos diploides de Uruguay por conglomerado	23
7. AMC morfológico y PCoA genético con los genotipos triploides	25

INTRODUCCIÓN

La papa, *Solanum tuberosum* L ($4x=2n=48$), es el cultivo hortícola más importante del mundo y el quinto cultivo en área cosechada y producción para la alimentación humana. Con un rendimiento que supera las 200.000 hg/ha (FAO, 2017), su significancia como fuente de carbohidratos, minerales y vitaminas en regiones templadas y tropicales del mundo continúa creciendo (Khoury *et al.*, 2014). Al igual que en otros cultivos, el proceso de domesticación ha llevado a la reducción de la riqueza de alelos y sus posibles combinaciones en los cultivares modernos (Hawkes, 1979; Wang *et al.*, 2011), ya que han sido desarrollados con una mínima o inexistente incorporación de variantes alélicas novedosas (Jansky *et al.*, 2013). El proceso de pérdida de riqueza alélica y por extensión de la capacidad de generar nuevas combinaciones se denomina erosión genética (Maxted y Guarino, 2004), y es uno de los factores que han conducido a que los cultivares de papa sean susceptibles a diversas enfermedades y pestes (Stevenson *et al.*, 2001; Wale *et al.*, 2008). En este sentido, el paradigma para afrontar los efectos de la erosión apunta desde hace un siglo a la incorporación de material genético proveniente de parientes silvestre a los programas de mejoramiento de papa (Hawkes, 1979; Camadro, 2012; Spooner *et al.*, 2014).

Los parientes silvestres de los cultivos son definidos por Maxted *et al.* (2006) como *“las plantas silvestres que conforman un taxón que tiene utilidad indirecta para la alimentación y la agricultura, derivado de su relativamente cercana relación filogenética con un cultivo; esta relación se define según el grado de parentesco entre el taxón silvestre y el cultivo en cuestión”*. Su importancia radica en los atributos beneficiosos que pueden aportar para mejorar el rendimiento y la estabilidad de los cultivos, siendo las poblaciones naturales el mejor reservorio de diversidad a la hora de encontrar nuevos genes y variantes alélicas que confieran adaptabilidad (Shah *et al.*, 2020). Estos nuevos genes y variantes son únicos, ya que surgen bajo presiones selectivas en un contexto genómico complejo y lleno de interacciones que no podremos simular por aproximaciones biotecnológicas. La caracterización y evaluación de los parientes silvestres de los cultivos es esencial para su conservación (Gepts, 2006) y le dan un valor agregado promoviendo su utilización en procesos productivos (Lobo, 2008). La relevancia de los parientes silvestres de los cultivos fue evidenciada a principios del siglo XX gracias al trabajo del botánico y genetista ruso Nikolái Ivánovich Vavílov (1887-1943). En primera instancia, Vavílov postuló la Ley de Series de Variaciones Homólogas, que explica cómo especies, géneros y familias relativamente cercanas siguen los mismos patrones evolutivos, es decir que desarrollan características homólogas. El mayor valor de esta ley es su

capacidad predictiva, puesto que cuanto más cercanos sean los taxones, más evidente será la homología (Vavilov, 1922). Esta ley aplica tanto para las especies cultivadas como para sus parientes silvestres y es el fundamento del segundo gran aporte de Vavílov: los centros de origen de las especies cultivadas. Es en los centros de origen y diversidad donde los mejoradores encontrarán las especies más emparentadas a los cultivos, portadoras de características homólogas y variantes novedosas (Loskutov, 1999). En particular para Sudamérica, Vavílov describió en 1940 el centro de origen Andino, con tres centros secundarios, el Andino (Perú, Bolivia, Ecuador), el de Bogotá, en Colombia (establecido por sus colaboradores S.M. Bukasov y S.V. Juzepchuk), y el Chileno (en el sur de Chile e islas vecinas), que es el centro de origen de *S. tuberosum* (Vavilov, 1940: “*The theory of the origin of cultivated plants after Darwin*”, en Loskutov, 1999).

Los parientes silvestres de *S. tuberosum* son encontrados en los ambientes más diversos de Sudamérica (Hijmans y Spooner, 2001) y si bien han sido usados ampliamente en el mejoramiento del cultivo (Hawkes, 1979; Camadro, 2012; Spooner *et al.*, 2014), aportando rusticidad y resiliencia, su uso se ve limitado. Esto se debe en parte a que, a pesar que se estima que el 40% de las especies silvestres de papa habían sido colectadas para 1987 (FAO, 1997), el segundo reporte del estado de los recursos genéticos del mundo para la alimentación y la agricultura (2010) indica que del total de los recursos genéticos en bancos de germoplasma*, sólo el 1,56% de las accesiones son recursos para papa (98285 accesiones), de los cuales un 15% corresponde a especies silvestres (aproximadamente 14743 accesiones, 0,23% del total de accesiones para todos los cultivos), con lo que difícilmente sean representativas de toda la variabilidad disponible en los centros de diversidad (Jansky *et al.*, 2013; Warschefsky *et al.*, 2014). Además, se estima que sólo un 10 % de las especies silvestres de papa han sido exploradas para utilizar en programas de mejoramiento (Budín y Gavrilenko, 1994). La baja representación de parientes silvestres de papa en las colecciones y la limitación en su uso se debe en parte a que las delimitaciones del grupo no son claras: presentan alta plasticidad fenotípica y reticulación genética (Jacobs *et al.*, 2011; Camadro *et al.*, 2012; Spooner *et al.*, 2014) y si bien se ha abordado el problema desde distintos enfoques (Raker y Spooner, 2002; Berg y Jacobs, 2007; Lou *et al.*, 2010; Jacobs *et al.*, 2011; Spooner *et al.*, 2014), pocos lo han hecho integrando distintas fuentes de información (Knapp *et al.*, 2004; Camadro *et al.*, 2012; Jansky *et al.*, 2015). El uso de parientes silvestres, en contraposición al uso de especies

* Se estima que los parientes silvestres de los cultivos comprenden el 2-6% en las colecciones de germoplasma a nivel mundial (Warschefsky *et al.*, 2014)

cultivadas emparentadas (cultivares y variedades criollas) en los programas de mejoramiento de *S. tuberosum* aporta grandes ventajas, como son la producción de híbridos con fertilidad masculina, mejor calidad de los tubérculos y más resistencia a estreses y enfermedades (Jansky y Peloquin, 2006). Varios trabajos han destacado la necesidad de la sistematización, integración y accesibilidad de la variabilidad de los recursos genéticos de papa para su conservación en poblaciones naturales y en colecciones *ex situ* (Camadro, 2012; Jansky *et al.*, 2013; Warschefsky *et al.*, 2014), así como de la identificación de sus nichos ecológicos para mejorar su protección *in situ* y representación en colecciones (Castañeda-Álvarez *et al.*, 2015), dado que no se conoce sistemáticamente cómo se estructuran y qué especies forman el complejo. Es necesario el estudio sistemático de los parientes silvestres de la papa con colectas exhaustivas que permitan enriquecer las colecciones, explorando la diversidad genética y morfológica de estas especies, así como sus atributos ecológicos, para preservarlas tanto *in situ* como *ex situ* y utilizarlas para mejorar la adaptabilidad del cultivo a los retos agronómicos actuales y futuros, identificando las especies y accesiones que pueden ser flamantes fuentes de resistencia y tolerancia a estreses bióticos y abióticos, para aumentar la resiliencia, ciertos aspectos de la calidad e indirectamente la productividad del cultígeno (Camadro, 2012; Spooner *et al.*, 2014; Warschefsky *et al.*, 2014; Castañeda-Alvarez *et al.*, 2015; Gaiero *et al.*, 2018).

Para Uruguay han sido citadas tres especies emparentadas con la papa pertenecientes a *Solanum* L. sect. Petota Dumort: *S. chacoense* Bitter, *S. commersonii* Dunal y *S. malmeanum* Bitter (Hawkes y Hjerting, 1969; Spooner *et al.*, 2014; Castañeda-Alvarez *et al.*, 2015) que tienen distribuciones geográficas comunes en el territorio nacional, el sur de Brasil y Argentina (Bohs *et al.*, [acceso en 01 abril 2020]) y son poseedoras de una gran diversidad morfológica (Prieto *et al.*, 2016; Dal Molin, 2017), molecular (Siri *et al.*, 2009; Silveira, 2018) y fisiológica (Pianzola *et al.*, 2005; Siri *et al.*, 2005). Los estudios se han centrado en *S. commersonii*, y su importancia radica en los múltiples atributos genéticos que la convierten en un recurso fitogenético excepcional. Presenta resistencia a *Ralstonia solanacearum*, causante de la marchitez bacteriana (Laferriere *et al.*, 1999; Kim-Lee *et al.*, 2005; Siri *et al.*, 2005, 2009; Galván *et al.*, 2007; González, 2010; González *et al.*, 2013; Narancio *et al.*, 2013; Carputo *et al.*, 2013; Andino, 2017), a los viri X e Y de la papa (Tozzini *et al.*, 1991; Carputo *et al.*, 2013;), a *Phytophthora infestans*, responsable del tizón tardío (Micheletto *et al.*, 2000), y a *Pectobacterium carotovorum*, causante de la podredumbre blanda (Carputo *et al.*, 2002; Carputo *et al.*, 2007), entre otras. Particularmente es interesante la resistencia a *R. solanacearum*, dada la ocurrencia ocasional de brotes agudos en Uruguay, que son muy difíciles de pre-

venir y controlar (Siri, 2010). De sus atributos también se destacan su resistencia al frío y su capacidad de aclimatación a bajas temperaturas (Cardi *et al.*, 1993; Palta y Simon, 1993; Chen *et al.*, 1999; Carputo *et al.*, 2013). Estos atributos, sumados a la gran diversidad genética que poseen (Pianzola *et al.*, 2005; Siri *et al.*, 2009; Carputo *et al.*, 2013; Sandro *et al.*, 2016; Dinges *et al.*, 2018; Silveira, 2018) las hacen sumamente atractivas para incluirlas en los programas de mejoramiento de papa ya que permitirían aumentar las resistencias y aportarían rusticidad a los cultivos de *S. tuberosum* actuales.

La diversidad genética de estas especies ha sido analizada utilizando marcadores moleculares neutros, pero los estudios se han centrado principalmente en *S. commersonii*. Siri *et al.* (2009) analizaron la diversidad molecular para 30 accesiones de *S. commersonii* mediante marcadores del tipo AFLP, RAPD y SSR, siendo éstos últimos los más variables debido a su mecanismo de generación de variabilidad. Silveira (2018) analizó 12 poblaciones naturales del Uruguay con ocho SSR de los cuales tres amplificaron exitosamente y fueron polimórficos. Ambos trabajos concluyen que existen al menos dos grupos genéticos diferentes, uno ocupando el litoral oeste del Uruguay y el otro al sur del Río Negro, a la vez que coinciden en recomendar el uso de más marcadores del tipo microsatélite polimórficos en futuros estudios. Silveira (2018) encontró además que la riqueza clonal no necesariamente se corresponde con la extensión de la población, por lo que colectando una o dos plantas por población se obtiene la misma representación de la variabilidad que con una mayor intensidad de colecta. Dinges *et al.* (2018) estudiaron la variabilidad molecular en un panel diverso y cruzamientos interpopulacionales de *S. chacoense* de las provincias de Tucumán y Buenos Aires (Argentina) con SSR diseñados en *S. commersonii*, obteniendo seis de ellos polimórficos y algunos de ellos presentaron alelos específicos de *S. chacoense*. Si bien estos estudios han sido un gran aporte al entendimiento de la diversidad genética de los parientes silvestres de la papa, un mayor número de genotipos o puntos de colecta y un aumento en el número de loci codominantes analizados permitiría un mayor entendimiento de la variabilidad genética de las poblaciones y cómo se estructura. El uso de claves morfológicas para determinar las accesiones no contempla la gran variabilidad morfológica que se observa en Uruguay, por lo que un enfoque multivariado en el análisis de estas características, acoplado al análisis genético, puede dar una visión integral de la diversidad. La importancia de conocer la variabilidad genética y morfológica de las poblaciones presentes en nuestro territorio es fundamental para asegurar su conservación y manejo, así como para su utilización en los programas de mejoramiento.

Morfológicamente, *S. commersonii* es descrita como hierba de hojas cortas, con el ápice del foliolo terminal obtuso a redondeado, siempre mucho más largo que los laterales pareados de cero a cinco pares, que disminuyen su tamaño hacia la base de la hoja; foliolos sésiles o con peciolulo corto, decurrentes en el raquis e interhojuelas en general ausentes (Hawkes y Hjerting, 1969; Morton, 1976). La inflorescencia es no ramificada con corolas estrelladas violetas, con los lobos de la corola 1,5 veces o más largos que anchos, más largos y angostos que *S. malmeanum*. Para *S. malmeanum*, se describe hojas más largas que *S. commersonii*, un foliolo terminal más ancho, pero apenas más largo que los laterales, dos-seis pareados que decrecen menos abruptamente que *S. commersonii* con peciolulos hasta cuatro milímetros, hojuelas en general dos a cinco pareadas. La corola es siempre blanca y los lobos apenas más largos que anchos (Hawkes y Hjerting, 1969). En cuanto a *S. chacoense*, se la describe como hierba arrosada, de 20 a 150 cm de largo con tallos alados y sin pigmentación. Las hojas son pinnadas, glabrescentes, con tres a ocho foliolos laterales peciolados de hasta ocho milímetros, y hojuelas ausentes a tres, y hasta diez pareadas, el foliolo terminal más ancho, pero igual de largo que los laterales, con ápice agudo a acuminado; la corola es estrellada y blanca, con lobos triangulares. (Hawkes y Hjerting, 1969; Morton, 1976). Sin embargo, estas especies presentan una alta variabilidad morfológica (Prieto *et al.*, 2016; Dal Molin, 2017) por lo que las características especie-específicas usadas para identificarlas muchas veces muestran estados comunes, ya que se trata de características de alta plasticidad y dependen del ambiente donde se evalúen (Hijmans y Spooner, 2001; Camadro, 2012). A su vez la posible ocurrencia de hibridaciones interespecíficas entre las especies de *Solanum* L. sect. *Petota* Dumort, y para el caso de nuestro territorio entre *S. chacoense*, *S. commersonii* y *S. malmeanum* (Hawkes y Hjerting, 1969; Siri *et al.*, 2009; Spooner *et al.*, 2014), así como la presencia de individuos triploides, dificulta aún más la interpretación morfológica y diferenciación o identificación entre las especies.

El material triploide colectado en nuestro país es descrito por Hawkes y Hjerting (1969) como “aberrante”, reconocible por tratarse de plantas más vigorosas con hojas y flores más grandes, cortas ramificaciones de la inflorescencia, anchos foliolos peciolulados e interhojuelas. A su vez, Tarn y Hawkes (1986) observaron morfologías de mayor tamaño que las esperadas para diploides en triploides artificiales de estas especies. Esta variación en la morfología de los organismos con ploidías mayores a dos es una generalidad del reino vegetal y recibe el nombre de *efecto nucleotípico*. El fenómeno es descrito por Bennett (1987) como los cambios fenotípicos y fisiológicos debidos a la variación de la relación volumen superficie de la célula y sus componentes a causa del

aumento de material genético, independientemente de la carga genética. Varios autores determinan el efecto nucleotípico basados en cambios cuantitativos en tamaño, actividad metabólica y desarrollo comparando con genotipos diploides (Tal, 1980; Bennett, 1987; Balao *et al.*, 2011; Hegarty *et al.*, 2013; Leal-Bertioli *et al.*, 2017). Siendo unos triploides más semejantes a *S. commersonii* y otros a *S. malmeanum*, Hawkes y Hjerting (1969) postulan estos organismos aberrantes como autotriploides, originados por la unión de gametos reducidos y no reducidos de individuos de una misma población. Otros autores proponen un origen híbrido entre *S. commersonii*, *S. malmeanum* y *S. chacoense*, debido a la facilidad de hibridación entre estas especies y la capacidad de sus gametos no reducidos para producir triploides intra e inter específicos (Tarn y Hawkes, 1986; Spooner *et al.*, 2014). Por otra parte, la cruzabilidad entre *S. chacoense* y *S. commersonii* ha sido reportada en hibridaciones dirigidas (Johnston y Hanneman, 1980, 1982) en general involucrando gametos no reducidos de la última. *S. chacoense* es también conocida por su capacidad de producir gametos 2n (Den Nijs y Peloquin, 1977b; Marks, 1996), lo que le da un amplio rango de posibilidades de hibridación interespecífica.

La distribución de estas especies en Uruguay no es clara y son muchas las zonas donde no hay colectas ni registros. Se espera que *S. commersonii* se distribuya en todo el territorio, mientras que *S. malmeanum* se distribuiría en el litoral norte de nuestro país (Bohs *et al.*, [acceso en 01 abril 2020]). Existen registros en MVFA de colectas de *S. chacoense* en el litoral sur y la región sur-suroeste del país. De todos modos, los registros son insuficientes para que permitan delimitar su distribución y la determinación de los ejemplares es ambigua (EL Camadro, com. Pers.). Distintos factores pueden estar determinando la distribución geográfica de las especies y su estructura genética. En nuestro país se ha propuesto que la morfología del territorio podría ser una de las causantes de la distribución de las especies vegetales (Chebataroff 1942, 1960), con algunas especies de plantas más asociadas a una región que a otra (Grela 2004). Asimismo, se han encontrado especies que aún en simpatria mantienen su identidad genética, con reducidos casos de híbridos viables (Turchetto *et al.*, 2014). En el género *Solanum* L. se han descrito barreras de aislamiento pre y postcigóticas (Camadro *et al.*, 2004), algunas de ellas superadas a través de la producción de gametos 2n y la poliploidización (den Nijs y Peloquin, 1977a, 1977b; Hanneman, 1999; Jansky, 2006; Camadro *et al.*, 2012; Spooner *et al.*, 2014) permitiendo la aparición de individuos híbridos en poblaciones naturales (Hawkes y Hjerting, 1969; Tarn y Hawkes, 1986; Bedonni y Camadro, 2009; Spooner *et al.*, 2014). Si bien estos híbridos pueden tener su fertilidad comprometida persisten de forma clonal, permitiendo que eventualmente se reproduzcan (Camadro *et al.*, 2012).

La introgresión de material genético al cultivo de papa se ve limitada por la presencia de barreras a la hibridación interespecífica interploide pre y postcigóticas. Dentro de las postcigóticas, la más común es la falla en el desarrollo del endosperma debido al desbalance entre la cantidad de genomas maternos y paternos (Johnston *et al.*, 1980; Camadro *et al.*, 2004; Spooner *et al.*, 2014). En 1980 Johnston *et al.* postularon la hipótesis del número de balance del endosperma, que establece necesaria una relación 2:1 entre los germoplasmas materno y paterno respectivamente para el correcto desarrollo del endosperma. Según esta hipótesis, cada especie tiene una ploidía efectiva (o EBN) que se le asigna a partir de su cruzabilidad con *S. chacoense* (2EBN), que puede ir de 1EBN en *S. commersonii* a 4EBN en *S. tuberosum* (Hanneman, 1994). Las especies que difieran en su valor de EBN deberán sufrir una modificación de su ploidía efectiva para poder hibridarse (Johnston y Hanneman, 1980, 1982; Carputo *et al.*, 1997; Carputo *et al.*, 2000). La poliploidización (ya sea espontánea o inducida artificialmente) es una de las estrategias más difundidas para sortear la barrera del EBN (Camadro *et al.*, 2004; Jansky, 2006) y ha sido de gran importancia en los procesos de especiación de las plantas tuberosas del género *Solanum*. El mecanismo más potente es la poliploidización sexual por gametos no reducidos, de hecho la mayoría de las especies del género presentan óvulos o polen $2n$ (Quinn *et al.*, 1974; den Nijs y Peloquin, 1977b; Carputo *et al.*, 2000) (e.g. *S. chacoense* es 2EBN y *S. commersonii* es 1EBN, por lo tanto, una correcta hibridación entre ellas requiere el doble de genomas de *S. commersonii*, es decir que el gameto aportado por ella sea $2n$, lo que derivaría en una progenie triploide).

En nuestro país el Programa Nacional de Mejoramiento en Papa inició en 1983 y cuenta con cuatro cultivares liberados (INIA, 2017). Los esfuerzos de introgresión de germoplasma silvestre a los cultivares de papa llevados a cabo por instituciones como INIA y UdelaR han mostrado buenos resultados de hibridación interespecífica y transferencia de resistencia a *Ralstonia solanacearum* en progenies avanzadas (González, 2010; Andino, 2017; Ferreira *et al.*, 2017; Gaiero *et al.*, 2017; Gaiero *et al.*, 2018). Se han obtenido materiales con diferencias en la habilidad combinatoria para resistencia a la enfermedad y características agronómicas, que ya están siendo evaluado en ensayos a campo en Brasil e *in vitro* en nuestro país para seleccionar los clones que mejor combinen las características agronómicas deseables con la resistencia *R. solanacearum*. (Vilaró, F., com. pers.). Aunque prometedores, estos resultados están marcados por poca diversidad de accesiones y el sesgo de búsqueda por caracteres de interés agronómico (Pianzola *et al.*, 2005; González, 2010), que son reflejo de la necesidad de obtener cultivares nacionales adaptados a las condicio-

nes locales y resistentes al patógeno mencionado (Galván *et al.*, 2007; González *et al.*, 2013 Andino, 2017).

El presente trabajo se enmarca en el proyecto CSIC I+D 2016_250 (Responsable Paola Gaiero) “Identificación de grupos genéticos y distribución de la variabilidad de papas silvestres para su conservación en colecciones núcleo y uso en mejoramiento genético”. Dicho proyecto trabaja en paralelo con el proyecto “Caracterização e avaliação de batatas-silvestres para o melhoramento da batata cultivada” dirigido por el Dr. Gustavo Heiden de EMBRAPA Clima Temperado (RS, Brasil). En conjunto, estos proyectos podrán abarcar una mayor área dentro de la distribución de estas especies de parientes silvestres de papa. A su vez abordarán el problema de forma sistemática, con un enfoque global de su diversidad genotípica y morfológica que permita conocer la estructura genética de las poblaciones y sus relaciones inter e intra específicas, que permitirá aprovechar más eficazmente los recursos genéticos de papa de nuestro país y la región.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

El objetivo de este trabajo es caracterizar mediante el uso de diversos marcadores morfológicos y moleculares una selección de accesiones de parientes silvestres de papa de Uruguay, y corroborar la capacidad de dichos marcadores para identificar entre las tres especies reportadas en el país y sus híbridos interespecíficos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar la diferenciación morfológica y molecular de los parientes silvestres de la papa presentes en Uruguay y comprobar si existe una correlación entre las características morfológicas y genéticas evaluadas.

Determinar la estructura geográfica de la variabilidad de los grupos morfológicos y genéticos identificados

Determinar qué grupos genéticos darían origen a los individuos triploides identificados mediante marcadores morfológicos y moleculares.

HIPÓTESIS

- 1- Los parientes silvestres de la papa se distribuyen en tres grupos, tanto por caracteres genéticos como morfológicos, que se corresponderían cada uno a las especies *S. commersonii*, *S. malmeanum* y *S. chacoense*. A su vez estos grupos los grupos genéticos y morfológicos se relacionan entre sí y con el origen geográfico de las accesiones
- 2- Las plantas que se distribuyen en el litoral norte se diferencian morfológica y genéticamente de las del resto del país.
- 3- Existen híbridos interespecíficos que se sitúan entre los grupos, teniendo características de ambas especies parentales. Los individuos triploides son parte de la población híbrida y son distinguibles genética y morfológicamente de los diploides.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal:

Para este trabajo se contó con colectas de accesiones de parientes silvestres de papa del territorio nacional, realizadas entre octubre de 2017 y marzo de 2018. Las colectas se realizaron cerca de caminos y rutas nacionales, ya que estas especies tienen gran facilidad para dispersarse en terrenos recientemente perturbados por el hombre, y frecuentemente se las encuentra donde ha habido obras viales. De cada población encontrada en el campo se colectaron hasta dos plantas, siguiendo la recomendación de Silvera (2018) para representar la variabilidad clonal de cada población sin realizar colectas redundantes. Las accesiones colectadas se plantaron en macetas de 3,5l para su recuperación fisiológica. La colección se mantuvo *in vivo* e *in vitro* en la Facultad de Agronomía de la UdelaR. Se midió la ploidía de las accesiones siguiendo el protocolo descrito en Vaio *et al.* (2007), la fluorescencia relativa de las muestras se obtuvo mediante un citómetro de flujo Partec Cyflow Space y los datos se analizaron en el programa Flomax. Las mediciones se realizaron en el servicio de citometría de flujo de Departamento de Biología Vegetal, Facultad de

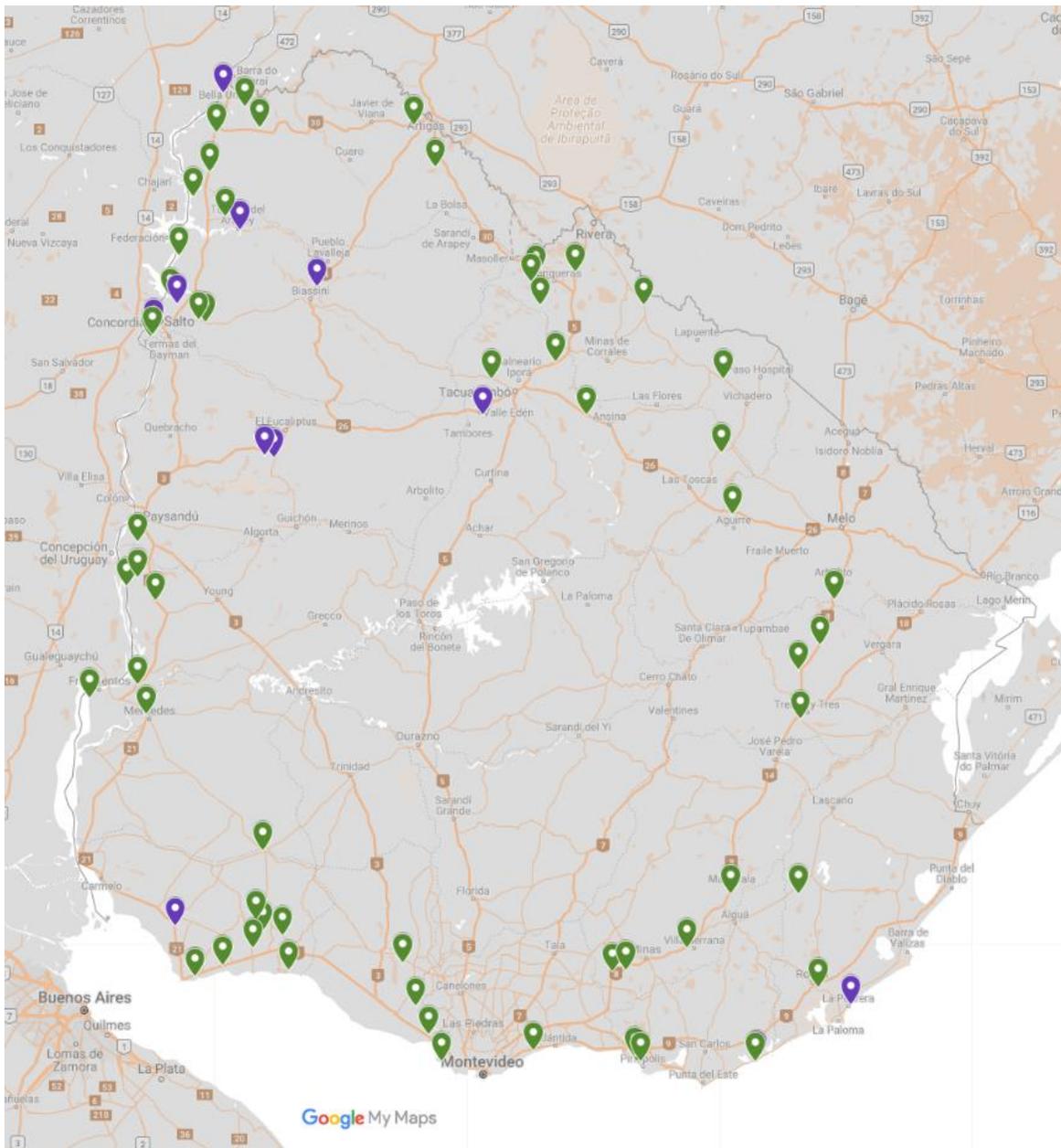


Figura 1: Mapa de las poblaciones de Uruguay analizadas. Los colores corresponden a la ploidía de las accesiones: diploides en verde y triploides en violeta.

Agronomía. Finalmente se seleccionaron 72 genotipos para analizar, en base a su estado fitosanitario al momento de la multiplicación, ploidía y origen geográfico (figura 1 y anexos tabla 1). Para las zonas de alta densidad de colecta se priorizaron las accesiones más distantes entre sí. Como grupo externo se seleccionaron dos genotipos de *S. chacoense* provenientes de Tucumán, Argentina, que a la vez funcionaron como testigos de dicha especie. No se utilizaron testigos de *S. commersonii* ni *S. malmeanum*. Cabe destacar que al momento de realizar la selección de los ge-

notipos no se habían realizado colectas en los departamentos de Durazno, Flores y Florida, por lo que las muestras de estos departamentos están siendo incluidas en otros estudios que se realizan en el marco del proyecto.

Las accesiones seleccionadas se multiplicaron según el protocolo de propagación de papa a través del sistema autotrófico hidropónico propuesto por Rigato *et al.* (2001) con las modificaciones introducidas por Claudia Braida (com. pers). A los 21 días de la multiplicación las plántulas fueron trasplantadas a macetas de 3,5l para permitir su desarrollo radicular. Se montó un ensayo en el invernáculo de condiciones controladas del Laboratorio de Evolución y Domesticación de Plantas (LEDP). El diseño experimental fue de bloques completos al azar con tres repeticiones, donde la unidad experimental fue cada maceta. En algunos casos las plántulas no lograron acondicionarse al trasplante y murieron, por lo que se produjeron nuevas plántulas que se incluyeron en un segundo ensayo con testigos de las cuatro regiones geográficas.

Caracterización morfológica:

Se eligieron treinta caracteres morfológicos de alta heredabilidad de las guías de caracterización morfológica básica de papa nativa del Centro Internacional de la Papa (CIP), elaboradas por Gómez (2000) y Huamán (2008), prestando atención a los caracteres evaluados previamente por Prieto (2016) y Dal Molin (2017) y a observaciones en material vivo de la colección y herborizado del herbario Bernardo Rosengurtt de Facultad de Agronomía, UdelaR (anexos tabla 2).

La caracterización se realizó entre octubre de 2018 y marzo de 2019 y consistió en tres etapas, siguiendo las recomendaciones del Centro Internacional de la Papa (CIP). Mediante la aplicación de licencia libre Google Forms (©Google, 2019) se crearon formularios en línea por cada etapa para tomar e ingresar los datos directamente a una planilla electrónica, junto con un registro fotográfico del hábito de crecimiento de la planta y de las hojas, flores, frutos y tubérculos caracterizados (figura 2). Este registro permitió revisar los datos y zanjar ambigüedades entre los clones de un mismo genotipo. La primera etapa de caracterización fue la floración, que comenzó cuando el 50% de las plantas del ensayo manifestaron ese estado. En esta etapa se midieron las características vegetativas de la planta hábito de crecimiento, color de tallo y pubescencia. La morfología foliar se evaluó en tres hojas por planta, a la que se le contaron los folíolos e interhojuelas y se le asignó una categoría de forma al foliolo terminal según su relación largo/ancho. Las hojas caracterizadas se fotografiaron en una cuadrícula de 5x5mm y se herborizaron. Se cortó una flor por



Figura 2: Fotografías ilustrativas de las distintas etapas del proceso de caracterización. Las plantas y sus órganos fueron registrados fotográficamente sobre cuadrículas de 5x5mm en las tres etapas de caracterización. Por columnas: A) plantas del este de la Cuchilla de Haedo y sur del país, B) plantas del Litoral Norte, C) genotipos triploides, D) testigos de *S. chacoense*.

planta sobre la cual se realizó la caracterización, que consistió asignar una categoría morfológica según la relación largo/ancho del pétalo y la determinación ocular de la coloración de la corola y el cáliz con la carta de colores de flor de Huamán (2008). Las flores se fotografiaron del haz y en-
 vés sobre una cuadrícula de 5x5mm y se fijaron en una solución 3:1 de etanol absoluto y ácido acético glacial. La segunda etapa fue la de fructificación. Cuando se observó que los frutos empezaban a cuajar se los embolsó para evitar que cayeran y se perdiera su identidad. Luego se cose-

charon los frutos maduros y se calculó la relación de largo/ancho para asignarles una forma. Se observó si tenían manchas blancas y cómo se distribuían y luego se cortaron transversalmente para contar la cantidad de carpelos y determinar si la unión de los carpelos generaba una hendidura. Cuando terminó la fructificación se comenzó a restringir el riego de las plantas para inducir la tuberización. Una vez senescentes, las plantas se cortaron y los tubérculos se cosecharon y lavaron para almacenarlos en bolsas de papel rotuladas dentro de contenedores plásticos dispuestos en las heladeras del banco de germoplasma de Facultad de Agronomía, con un recipiente con agua para controlar la humedad hasta la caracterización. Para la caracterización se masó el total de tubérculos y se midió su tamaño sobre el eje del ombligo. Se determinó visualmente la forma general de los tubérculos, así como las formas raras cuando estaban presentes. Para evaluar la coloración primaria y secundaria de la piel y la de la carne del tubérculo se utilizó la carta de color de tubérculo publicada por Huamán (2008), y luego se observó la distribución del color secundario de la piel cuando estuvo presente. Finalmente se midió la profundidad de los ojos con un calibre. Tanto los frutos como los tubérculos fueron fotografiados sobre las cuadrículas mencionadas anteriormente. Todas las medidas realizadas fueron categóricas ya que se utilizaron para calcular las relaciones de tamaño de los diferentes órganos y asignar una forma o rango posibles. Al finalizar la caracterización, la matriz de datos crudos se componía de registros desiguales para gran parte de los genotipos. Esto sucedió debido a que algunos clones no alcanzaron una etapa de caracterización (es decir no floreció, fructificó ni/o produjo tubérculos) o porque no fue posible la toma de datos en alguna de las instancias de evaluación. También hubo genotipos con más de tres registros debido a que fueron replicados o usados como testigos del primer ensayo en el segundo. En el caso de los frutos, los registros extra se debieron a que se fueron colectando y caracterizando en la medida en que iban madurando, que no fue simultáneamente para todos los frutos del clon.

Caracterización Molecular:

Primariamente se extrajo ADN de las accesiones de la muestra utilizando el kit de extracción (Zymo Quick DNA Plant/Seed kit, no. cat. D6020, Zymo Research). Se evaluó en ocho accesiones el grado de polimorfismo de 17 marcadores tipo microsatélite (SSR), diseñados en *S. tuberosum* y *S. commersonii* (Ghislain *et al.* 2009; Sandro *et al.* 2016), y seleccionados en base a su comportamiento en trabajos anteriores (Sandro *et al.* 2016; Dinges *et al.* 2018; Silveira 2018) y a su rango de amplificación. Se seleccionaron los nueve SSR más polimórficos para amplificar en la muestra (tabla 1). La amplificación de los fragmentos se realizó por medio de PCR; la reacción consistió en

PCR tampón 1x, MgCl₂ 1,5mM, dNTPs 0,15mM, M13 0,40μM, cebador iniciador 0,30μM, cebador reverso 4,5μM, BSA 0,80μg, Taq 0,60U/μL, ADN 150μg y H₂O hasta completar un volumen de 15μL. 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 51 a 56°C por 1 min dependiendo del cebador (tabla 1), elongación a 72°C por 1 min y finalmente un ciclo de extensión a 72°C por 4 min, seguida por 10°C de tiempo indefinido hasta el almacenamiento a -20°C. El producto de amplificación se corrió en un gel de agarosa [1%] a 150 V durante 1 h, teñido posteriormente con bromuro de etidio durante 5 min y lavado en agua durante 10 min. Confirmada la amplificación del fragmento objetivo, las muestras fueron acondicionadas y enviadas al servicio de secuenciación del DNA Fragment Analysis Facility de la Universidad de Yale. La lectura y genotipado se realizó con el programa Peak Scanner™ Versión: 1.0.

Tabla 1: SSR utilizados en la caracterización genética. Los marcadores moleculares de secuencia repetida simple utilizados se seleccionaron en base a su polimorfismo. Los nueve loci seleccionados presentaron en promedio 17 alelos, con un rango entre ocho y 32 alelos detectados.

Locus	Cantidad de alelos	Rango	Temperatura de alineamiento (°C)
A91	32	164-252	54
A72	30	255-317	53
A2	11	174-232	53
555995R2	16	130-181	55-56
A97	13	255-289	51
393707R1	8	90-129	54
STM0037	14	81-119	53
A55	24	130-236	53
STM2028	9	277-422	56

Análisis Estadístico

El análisis estadístico de los datos morfológicos se realizó mediante el software estadístico R (R Core Team, 2018). Pevio al análisis se obtuvieron medias ajustadas por genotipo para cada variable usando el siguiente modelo mixto lineal generalizado:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \gamma_k + \varepsilon_{ijk}$$

donde Y_{ijk} es la variable de respuesta, μ es la media poblacional, α_i es el efecto del i-ésimo genotipo, β_j es el efecto del j-ésimo bloque, γ_k es el efecto del k-ésimo ensayo y ε_{ijk} es el error experi-

mental. Los efectos aleatorios se encuentran subrayados en la fórmula. La función link utilizada fue el “log” de la familia de distribuciones Poisson.

Con las medias ajustadas se construyó una matriz con información de los 74 genotipos evaluados y las 30 variables evaluadas. Los genotipos triploides se excluyeron de la matriz para analizar sólo los genotipos diploides, evitando así que un posible efecto nucleotípico forzara los agrupamientos. Finalmente se realizó una imputación de los datos faltantes con el comando MICE del paquete homónimo de R (van Buuren y Groothuis-Oudshoorn, 2011). De la estandarización de los datos surgieron nuevas categorías para algunas variables, que según la variable tuvieron mayor o menor influencia en la definición de los grupos. Estas nuevas categorías aparecen debido a que se optó por registrar todos los estados que se encontraron en un mismo clon y entre clones de un genotipo, en vez de elegir sólo el estado más prevalente. Se deben también a la existencia de datos faltantes, debido a clones que se perdieron o no entraron en alguna de las etapas de la caracterización (e.g. no fructificaron o no produjeron tubérculos). La información faltante en la matriz de medias generada con la estandarización se imputó modelando en base a los datos existentes para poder aplicar el modelo estadístico.

Sobre la matriz resultante se realizó un análisis de correspondencias múltiples (ACM) (Husson, Lê, y Pagès, 2011) incluido en el paquete FactoMineR (Lê, Josse, y Husson, 2008). El ACM es una extensión del análisis de correspondencias, que permite analizar variables cualitativas dependientes. El ACM genera una matriz indicadora al convertir cada categoría de cada variable en una variable binaria, y luego aplica un análisis de correspondencias sobre dicha matriz indicadora (Abdi y Valentin, 2007). Los agrupamientos morfológicos fueron obtenidos a partir de la herramienta HCPC (Husson, Le Ray y Molto), también del paquete FactoMineR, que realiza un agrupamiento jerárquico aglomerativo de los resultados de un análisis factorial (métrica euclidiana, método de Ward). Una de las posibilidades que nos da esta herramienta es analizar los conglomerados según las variables que los definieron y las categorías que los determinaron (anexos tabla 4). Para saber a qué especie correspondía cada grupo se aplicó la clave de propuesta por Hawkes y Hjerting (1969) al genotipo más cercano al centro del grupo.

El análisis estadístico de los datos moleculares se realizó con el complemento GenAEx 6.5 de Microsoft Excel (Peakall y Smouse, 2006, 2012). Dado que los microsatélites son marcadores moleculares codominantes (es decir que ambas variantes alélicas son visibles por lo que evidencian heterocigosis), y dado que GenAEx no tiene un complemento para analizar codominancia de tres ale-

los simultáneamente, los triploides fueron excluidos de la primera parte del análisis y sus datos moleculares no fueron utilizados. Para determinar diferencias entre genotipos diploides, se calcularon las distancias genéticas y a partir de ellas se realizó un análisis de coordenadas principales (PCoA). Para evaluar la correlación entre los grupos genéticos observados y el agrupamiento morfológico previo se categorizaron los genotipos según el conglomerado que le asignó el HCPC morfológico. Se realizaron test de Mantel entre las matrices de distancias morfológicas y genéticas, entre las geográficas y morfológicas, y entre las de geográficas y genéticas, para determinar si existió una correlación que explique los agrupamientos y si estos estaban asociados a alguna región particular del territorio (Mantel, 1967). Los test fueron realizados con 999 iteraciones remuestreando la matriz.

Finalmente se analizó la estructuración genética de las poblaciones mediante un AMOVA. Dado que las colectas se llevaron a cabo según las recomendaciones de Silvera (2018) y que para conformar la muestra analizada en este trabajo se priorizó que los genotipos no tuviesen un origen geográfico cercano, el número de individuos analizados por población natural fue uno. Esto llevó a que al momento de determinar los parámetros para el AMOVA se tuviera el mismo número de accesiones que de poblaciones. Se tomó el enfoque de determinar cómo poblaciones a los grupos jerárquicos del análisis morfológico, por lo que el AMOVA evidenció heterocigosidad interpoblacional y variabilidad intra e interconglomerado.

Para estudiar su origen, los triploides fueron reincorporados al conjunto de datos morfológicos y mediante el comando MICE se generó una nueva matriz con los datos faltantes imputados. Sobre esta nueva matriz se aplicó el análisis de correspondencias múltiples y las coordenadas de cada genotipo se extrajeron para graficar los resultados en Microsoft Excel (2013). Se catalogó cada genotipo de acuerdo a su ploidía y a su origen geográfico. Posteriormente su origen fue estudiado a partir de los datos de marcadores moleculares. Para esto fueron evaluados conjuntamente con los diploides, catalogados por su origen geográfico y ploidía. El formato de datos codominantes de GenAEx no permite analizar los individuos como triploides por lo que se le asignó a cada variante alélica la categoría de locus dominante. De esta forma, si un genotipo tenía un alelo dado se le asignaba un valor igual a 1, y si no lo tenía se le asignaba 0. La matriz binaria resultante contabilizó un total de 162 columnas, correspondientes a la suma de todos los alelos de los nueve loci ampliificados. Este tratamiento ya había sido empleado por Silvera (2018) en las mismas especies.

Grupos morfológicos y genéticos de individuos diploides

Las tres primeras dimensiones del AMC para las características morfológicas explicaron el 15,9% de la variabilidad acumulada (6,3%, 5,1% y 4,6% respectivamente) (figura 3). A pesar de esto en la representación gráfica del Análisis de correspondencias múltiples de los datos morfológicos se observa una distribución de los genotipos sobre el eje de la primera dimensión en dos nubes de puntos más o menos definidas

El agrupamiento jerárquico del AMC resultó en la formación de dos conglomerados morfológicos principales, conteniendo 28 y 30 plantas (conglomerado 2 y 3 respectivamente) y un tercer conglomerado (conglomerado 1) conteniendo sólo 4 genotipos, los dos genotipos de *S. chacoense* de Tucumán, uno de Río Negro (RN7P1), y uno de Montevideo (Mo1P29). La variable conglomerado resultó determinada por las variables CtubB, FAFT, FBFT, Ccal, Fflo, Ftub, Pub, CfloB, Cstem, DCtubB, CfloIn, Ttub, Cfru, NFP, CfloBIn, NIHP, CtubIn y Ffru (anexas tabla 2). Diecisiete categorías de 13 variables definieron el conglomerado 1, ya sea por su presencia o ausencia, el conglomerado 2 fue descrito por 28 categorías de 13 variables, y el conglomerado 3 corresponden 17 a variables representadas en 33 categorías (anexas tabla 4). A modo de ejemplo describo el conglomerado 1, el cual contuvo el 60% de los genotipos glabrescentes (8,1% del total), que representaron el 75% de los genotipos del conglomerado. El 100% de los genotipos contabilizaron 4 pares de folíolos principales, esto representa el 19,1% de los genotipos en esta categoría, que contiene 33,9% de la muestra. Respecto a los folíolos secundarios sobre el raquis, el conglomerado contuvo el 30,0% de los genotipos con 3 pares (16,1% en la muestra caracterizada). Todos los genotipos tuvieron frutos esféricos, que aparecieron en el 22,6% de los genotipos y el conglomerado 1 contuvo el 28,6% del total. El 75% de los genotipos tuvo frutos verdes con abundantes manchas blancas y ninguno fue completamente verde. Para ninguno de los genotipos el color secundario de la piel del tubérculo fue ausente, categoría presente en el 66,1% de la muestra. El morado rojizo fue el color secundario predominante en el conglomerado (50%) y su distribución fue en manchas dispersas para el 75% del grupo. Si bien este tipo de análisis no permitió elaborar una lista de variables discriminatorias de cada conglomerado, en la tabla 4 (anexas) se incluyen los pesos que tiene cada categoría de cada variable en la descripción de los conglomerados.

El análisis de coordenadas principales de los marcadores SSR explicó una mayor proporción de la variabilidad total y nuevamente se observó una separación sobre el eje de la primera dimensión, aunque con mayor dispersión de las nubes de puntos resultantes. Las plantas formaron dos gru-

pos más o menos definidos con algunos genotipos dispuestos más bien centrales en la distribución, como es el caso de los genotipos incluidos en el conglomerado 1 (figura 4). Las tres primeras dimensiones explicaron el 29,3% de la variabilidad total (18,4%, 5,7% y 5,2% respectivamente).

Para saber si los agrupamientos morfológicos y genéticos coincidían se identificaron los genotipos del PCoA con el conglomerado que había recibido cada genotipo en el ACM (figuras 3 y 4). Al observar coincidencia en los agrupamientos se realizó un test de correlación de Mantel entre las distancias morfológicas y genéticas, no siendo posible encontrar una correlación clara entre ambos enfoques ($R^2 = 0,0508$) (figura 5a).

La geolocalización de los genotipos ubicó al conglomerado 2 en la región noroeste principalmente (71,4% de los genotipos), con 6 genotipos en la región sureste (Ro3P1, CL2P1, L7P1, M1P29, M6P15 y M6P6), una en la región suroeste (C14P1) y una en el noreste (R2P1). El conglomerado 3 se correspondió con los genotipos del resto del país. Ningún genotipo del conglomerado 3 resultó proveniente del noroeste (figura 6). Se realizaron pruebas de Mantel entre las distancias genéticas y geográficas (figura 5b) y entre las morfológicas y geográficas (figura 5c) para determinar si los agrupamientos se debieron a la región de origen de las accesiones ($R^2 = 0,0958$ y $R^2 = 0,034$, respectivamente). Los resultados no dan un soporte estadístico para decir que las distancias genéticas y morfológicas se deben a las distancias geográficas entre los orígenes de las accesiones.

El AMOVA realizado para ver la estructuración de la variabilidad genética de la muestra arrojó un valor de F_{st} de 0,139 ($p=0,001$). La mayor variabilidad genética (61%) fue entre individuos (como únicos representantes de cada población), mientras que la variabilidad dentro de los conglomerados (25%) fue mayor que la registrada entre conglomerados (14%).

El conglomerado 1 se determinó como *S. chacoense* por contener a los dos testigos de dicha especie originarios de Tucumán, Argentina. Por no contar con testigos de las otras dos especies, para la determinación de los conglomerados 2 y 3 se seleccionó el genotipo más cercano al centro de cada conglomerado (RN3P1 y So1P1, respectivamente) y se les aplicó la clave dicotómica propuesta por Hawkes y Hjerting (1969). La determinación resultó en *S. malmeanum* para el conglomerado 2 y *S. commersonii* para el conglomerado 3.

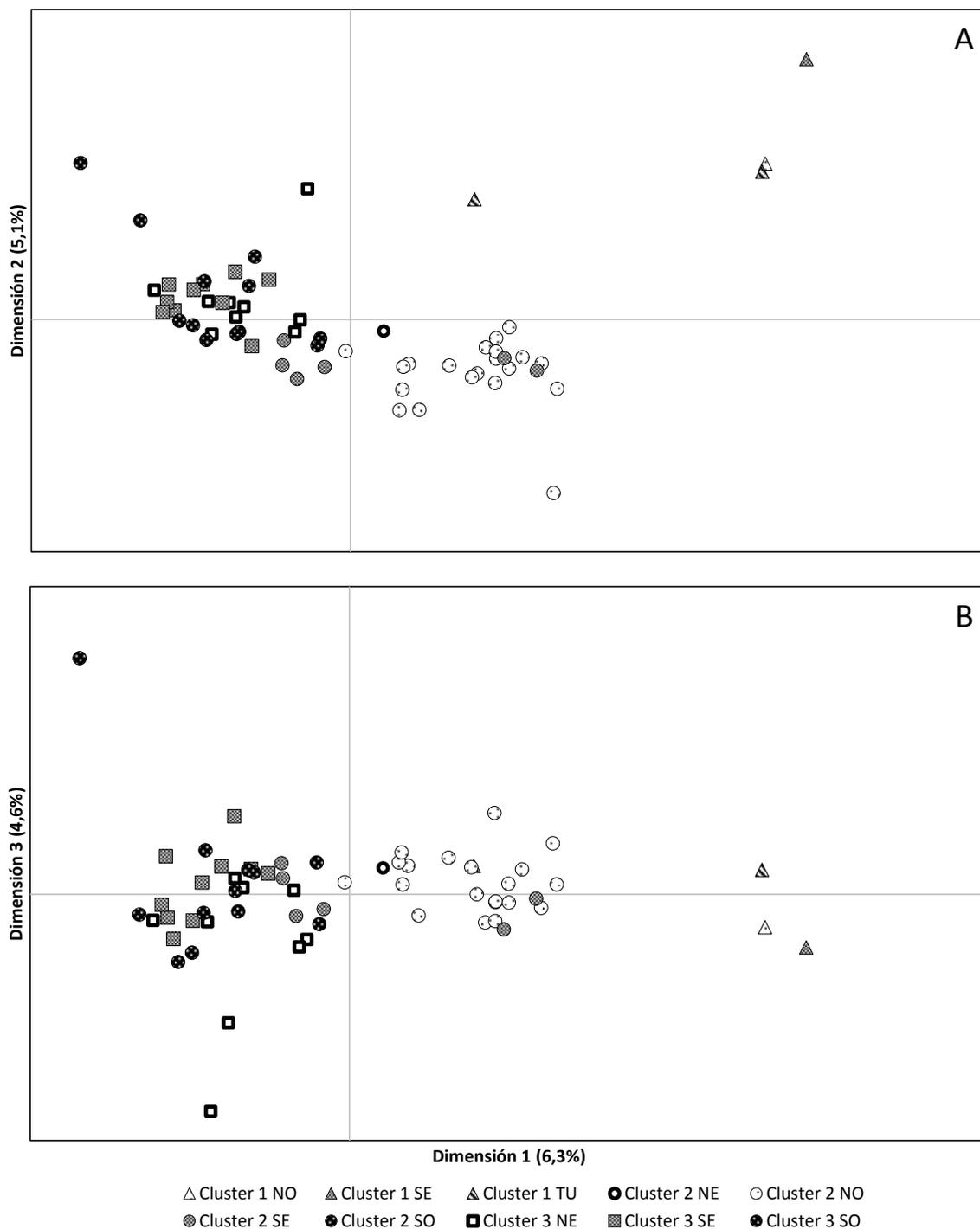


Figura 3: AMC. Representación de las poblaciones diploides de papas silvestres de Uruguay y los testigos de *S. chacoense* de Argentina analizadas, mediante un análisis de correspondencias múltiples para las 30 variables morfológicas evaluadas. Los agrupamientos se obtuvieron mediante un agrupamiento jerárquico de componentes principales. Los entramados responden al origen geográfico de dichas poblaciones. NE: noreste, SE: sureste, NO: noroeste, SO: suroeste, TU: Tucumán (Argentina). A) Primera y segunda dimensión, B) Primera y tercera dimensión.

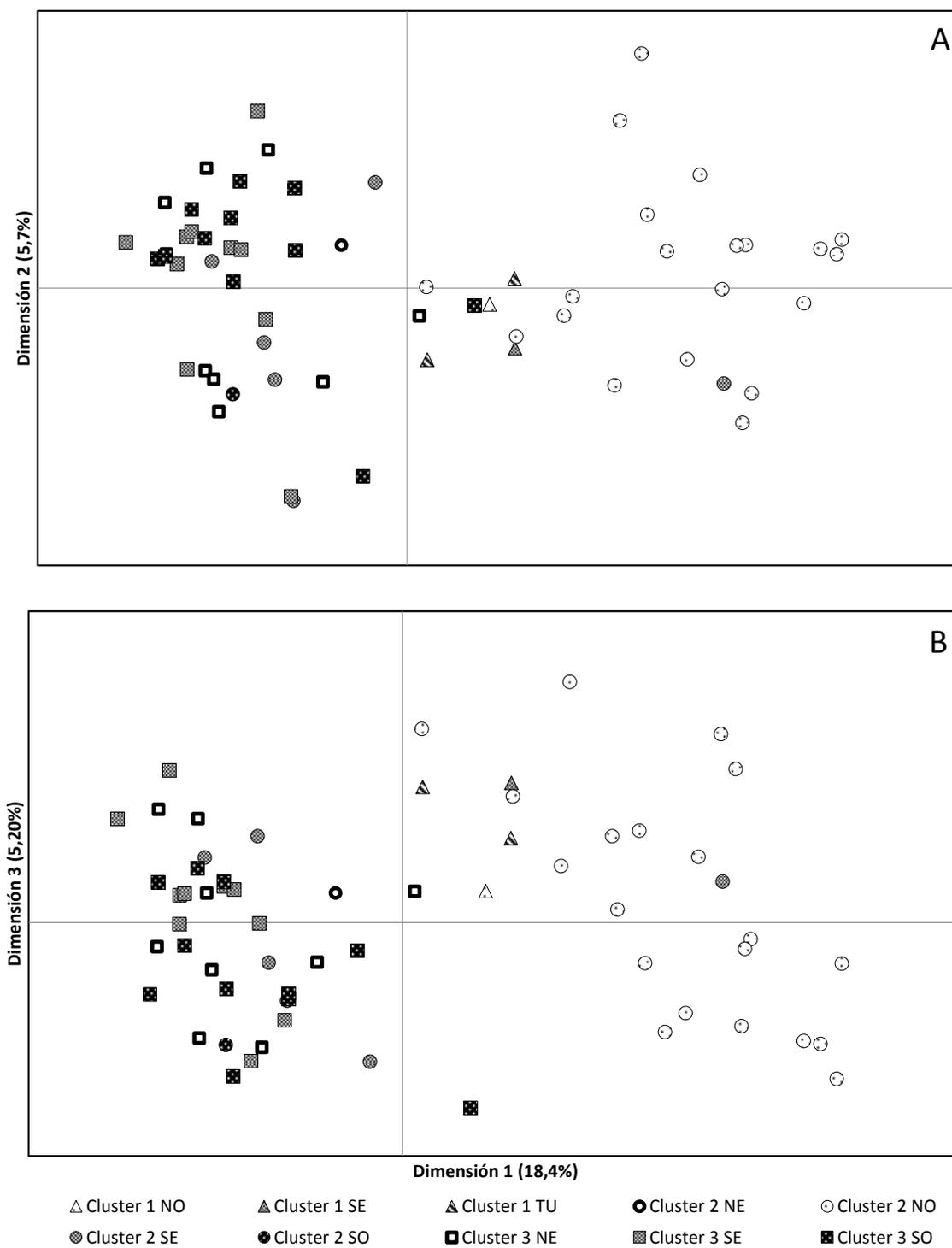


Figura 4: PCoA. Representación de las poblaciones diploides de papas silvestres de Uruguay y los testigos de *S. chacoense* de Argentina analizadas, mediante un análisis de componentes principales para los nueve loci evaluados. Los agrupamientos se obtuvieron del agrupamiento jerárquico de componentes principales realizado al análisis de correspondencias múltiples de las variables morfológicas. Los entramados responden al origen geográfico de dichas poblaciones. NE: noreste, SE: sureste, NO: noroeste, SO: suroeste, TU: Tucumán (Argentina). A) Primera y segunda dimensión, B) Primera y tercera dimensión.

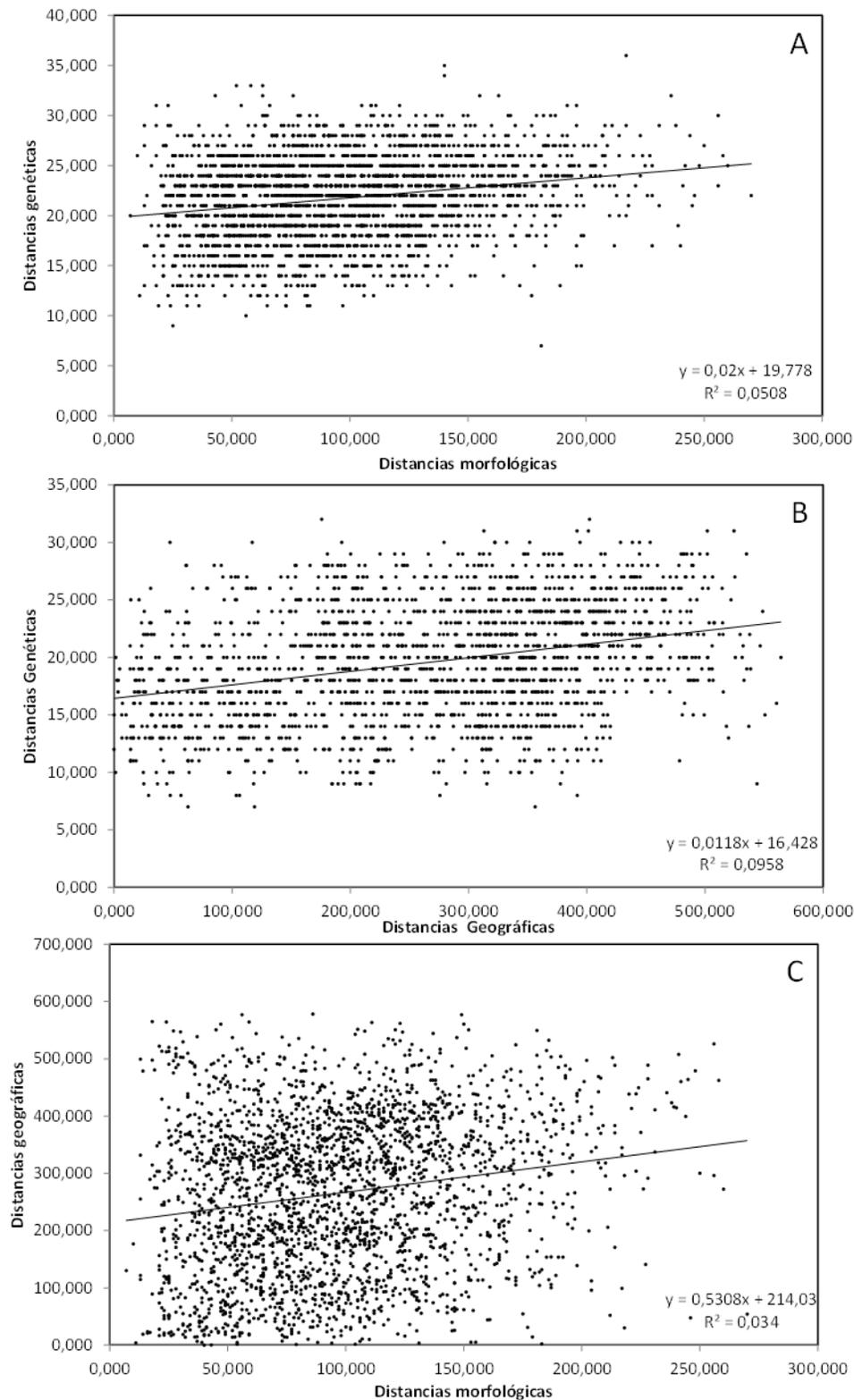


Figura 5: Test de Mantel. Correlogramas de distancias morfológicas contra genéticas (A), geográficas contra genéticas (B), y morfológicas contra geográficas (C). En los tres casos las correlaciones fueron significativas (999 iteraciones). Las dos accesiones de *S. chacoense* de Tucumán fueron excluidas para estos análisis.

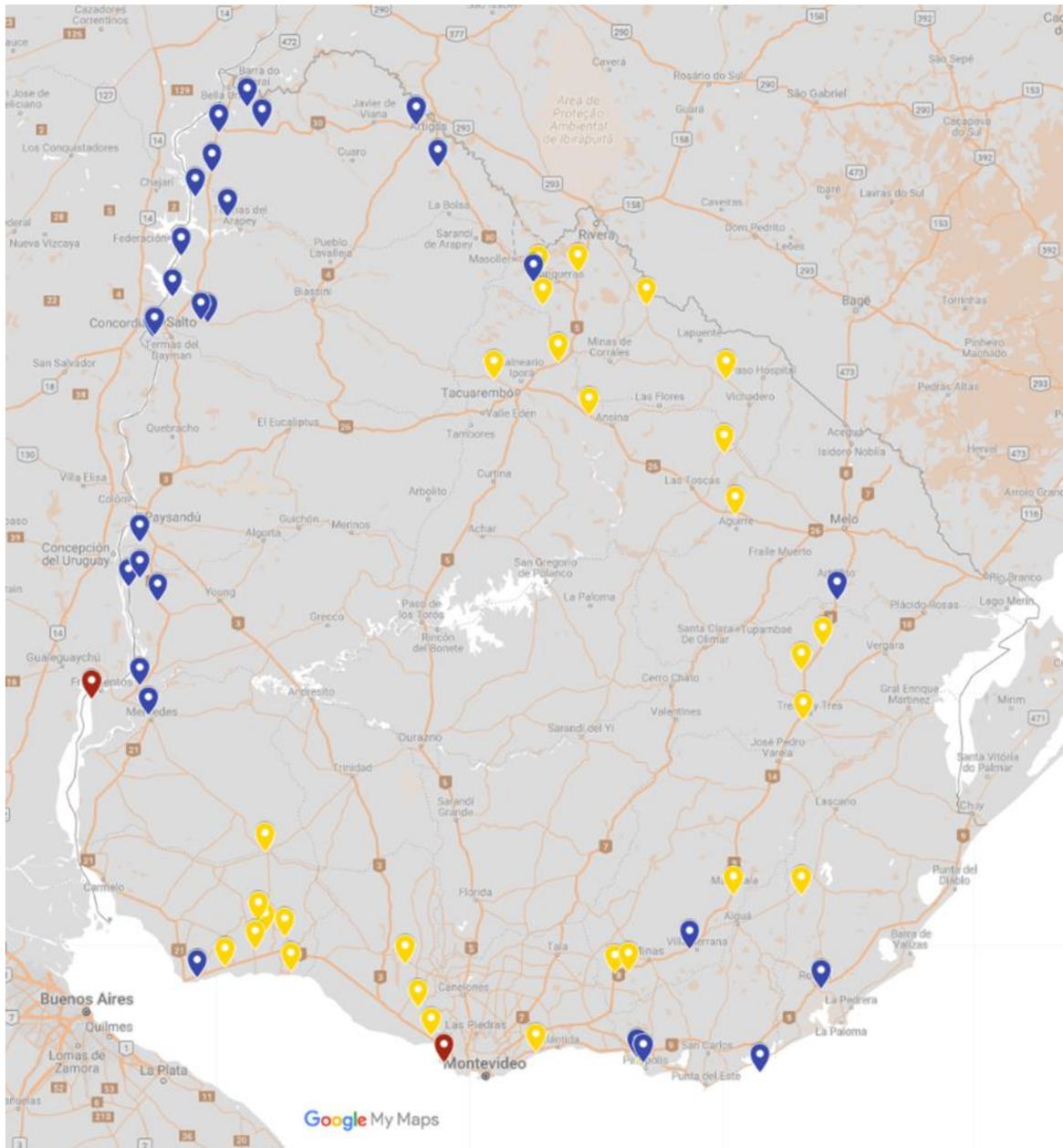


Figura 6: Mapa de las poblaciones diploides de Uruguay analizadas. Los colores corresponden al agrupamiento morfológico: clúster 1 en rojo, clúster 2 en azul y clúster 3 en amarillo. A la fecha se cuenta con accesiones del centro del país que serán incluidas en estudios posteriores, en los que se combinará también información de accesiones del sur de Brasil.

Localización de los individuos triploides en los grupos morfológicos y genéticos definidos

De los doce genotipos triploides incluidos en el análisis tres no alcanzaron la etapa de floración en el período de caracterización (A9P2, P2P1 y S35P1) y otros tres florecieron pero no fructificaron (P2P2, S5P3 y T3P2). Los seis genotipos restantes pudieron ser caracterizados en todas las etapas. Al ser incorporados a los análisis de componentes principales, los triploides se agruparon junto con los diploides, mostrando que su presencia no afecta la estructura de la especie (figura 7). Mientras que en el PCoA genético no se los pudo separar de la población de origen y se agruparon con los genotipos diploides de su región (figura 7a), en el análisis morfológico los genotipos triploides mostraron una tendencia a agruparse próximos al origen de coordenadas (figura 7b), evidenciando un efecto nucleotípico. Si bien las características evaluadas no son cuantitativas se logró detectar este efecto a partir de características morfológicas categóricas.

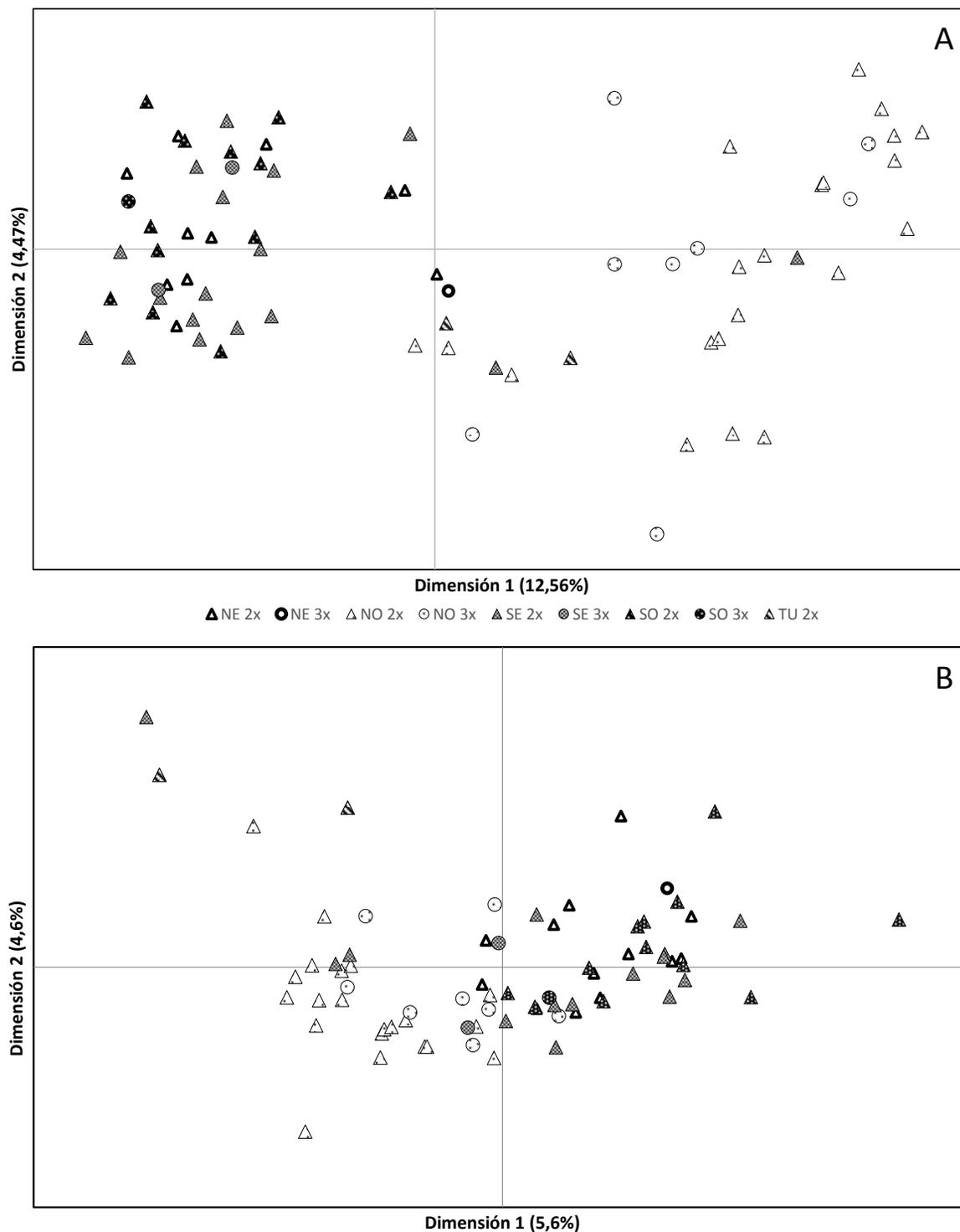


Figura 7: PCoA (A) y AMC (B). Representación de las poblaciones diploides (triángulos) y triploides (círculos) de papas silvestres de Uruguay y Argentina estudiadas en este trabajo. Los entramados responden al origen geográfico de dichas poblaciones. NE: noreste, SE: sureste, NO: noroeste, SO: suroeste, TU: Tucumán (Argentina)

DISCUSIÓN

El presente trabajo analiza la variabilidad de parientes silvestres de papa del Uruguay a partir de la combinación de marcadores morfológicos y moleculares integrando ambas fuentes de información, que resultaron complementarias y consistentes entre sí. La variabilidad de los datos permitió definir dos grupos morfológicos principales que se corresponden con los grupos genéticos y que a su vez se distribuyen en zonas distintas del país, como se observa en el mapa de la figura 5. Las discontinuidades y agrupamientos en este primer análisis sugieren una regionalización para este grupo de especies en Uruguay.

Encontramos variables discriminantes en todos los estadios de caracterización, que permitieron agrupar los genotipos en 3 conglomerados morfológicos. El hecho de que las guías de caracterización utilizadas hayan sido diseñadas para variedades cultivadas y no silvestres, y que se haya usado una selección de los marcadores morfológicos allí propuestos, primando los cualitativos por su practicidad a la hora de tomar los datos pueden ser motivos de que las 3 primeras dimensiones del AMC explicaran sólo el 15,9% de la variabilidad. De todos modos, este trabajo preliminar permitió identificar grupos congruentes entre varias fuentes de información y conservó suficiente material en el que se buscarán características específicas que distingan a estas especies silvestres. Esa caracterización se ampliará a toda la colección y se comparará con las caracterizaciones realizadas en el sur de Brasil por G Heiden y su equipo. En el trabajo que está en marcha, se estará en condiciones de apoyar o no el estatus específico de estos agrupamientos y seleccionar y registrar nuevos caracteres específicamente con el propósito de discriminar entre especies y elaborar finalmente una clave, aunque ya hay algunas variables promisorias que se detallan a continuación.

Algunas de las variables que definieron los conglomerados ya habían sido postuladas como discriminantes importantes de la variabilidad en estudios previos, como el número de folíolos laterales e interhojuelas sobre el raquis, la forma de la flor y las coloraciones de tallos, flores, frutos y tubérculos (Prieto *et al.*, 2016; Dal Molin, 2017). El número de pares de folíolos primarios y la cantidad y posición de las interhojuelas fueron importantes en la definición de los conglomerados de este trabajo. Las características de coloración de los tubérculos fueron suficientemente variables y aportaron al agrupamiento de los genotipos en los tres conglomerados, en concordancia con lo postulado por Dal Molín (2017). La coloración de las flores fue también importante para determinar los tres grupos; la variabilidad de la coloración en sus distintos marcadores y cómo esta influyó en el agrupamiento también concuerdan con los resultados de Dal Molín (2017), que

sugiere que estas características son fundamentales para determinar estas especies. La coloración de la flor había sido mencionada por Hawkes y Hjerting (1969) previamente, incluyendo como características diagnósticas también la forma de la flor y la morfología foliar. Asimismo, los autores habían mencionado diferencias en el tamaño y la coloración de la piel del tubérculo y la forma del fruto como características que podían diferenciar las especies *S. malmeanum* y *S. commersonii*. Estas variables, junto con el grado de pubescencia, la coloración del fruto y la forma del tubérculo, fueron las más discriminantes a la hora de definir los grupos morfológicos.

Los conglomerados delimitados ocupan regiones geográficas definidas: el conglomerado 2 se distribuye fundamentalmente el litoral norte del país, mientras que el conglomerado 3 se distribuye en el resto del territorio (figura 6). Las plantas del conglomerado 2 presentaron características morfológicas que las hacen comparables con la descripción de *S. malmeanum* de Hawkes y Hjerting (1969), a su vez las plantas del conglomerado 3 se ajustan a la descripción de *S. commersonii*, lo que concuerda con lo encontrado por Siri *et al.* (2009) en análisis moleculares de estas especies. Estas diferencias genéticas entre las poblaciones de papas silvestres del litoral norte y el resto del país también fueron encontradas por Silvera (2018), mencionando que la morfología atípica de las plantas del litoral las relaciona con *S. chacoense*. Incluir en este estudio testigos de *S. chacoense* permitió el análisis morfológico comparativo con la muestra evidenciando que las poblaciones del litoral norte no están tan relacionadas con dicha especie, y que si bien comparten algunas características morfológicas estarían más relacionadas con *S. malmeanum*. Es de destacar que los resultados obtenidos en este trabajo son el producto de un análisis sistemático de la diversidad de estas especies, que aborda la variabilidad morfológica y la genética de forma conjunta, lo que acumula evidencia sobre la distribución de la diversidad en dos clados principales. No obstante, puede existir un sesgo de colecta, dada la ausencia de genotipos del centro del país y el hecho de que las colectas fueron realizadas al borde de los caminos, que son de alta actividad antrópica. Si bien algunos genotipos del conglomerado 2 no se resuelven con claridad y necesitan un análisis más exhaustivo, los resultados obtenidos permiten asociar la distribución de *S. malmeanum* principalmente al litoral norte del país, entre la cuchilla de Haedo y el río Negro, y a *S. commersonii* a una distribución mucho más amplia, que si bien abarca todo el país, excluye la región dominada por *S. malmeanum*. Esta distribución parece coincidir con las zonas geomorfológicas y fitogeográficas propuestas para Uruguay por Chebataroff (1942, 1960) y revisadas por Grela (2004) quien además observa que la clara diferencia entre la geomorfología de las regiones podría ser causal de las propuestas floras occidental y oriental.

El valor de F_{st} obtenido (0,139) indica que la estructuración genética de los conglomerados es baja. Esto concuerda con los valores esperados para especies que comparten características de historia de vida (superposición de generaciones y distribución regional) y sistema reproductivo (alogamia y autoincompatibilidad) con las papas silvestres (Hamrick y Godt, 1996). La alta heterocigosis y la baja estructura poblacional encontradas se condicen con lo propuesto por Jacobs et al. (2011) que agrupa como subespecies a *S. commersonii* y *S. malmeanum*, e incluye a *S. chacoense* dentro de un grupo de especies de la sección Petota que tendría facilidad para intercambiar material genético con especies que compartan o hayan compartido distribución geográfica, en contraposición a la hipótesis de que las especies *S. commersonii* y *S. malmeanum* tienen fuertes barreras a la hibridación con *S. chacoense* (Hawkes y Hjerting, 1969). Si bien los resultados indican la existencia de dos grupos genéticos asociados a dos regiones del país, la falta de estructuración podría indicar la ocurrencia de flujo génico entre ellos.

El patrón de distribución geográfica de la variabilidad observado en este trabajo ya había sido reportado por distintos autores en varios complejos de especies de Uruguay, algunas con características similares a las papas silvestres. Ando et al. (1995) y Kokubun et al. (1997) encontraron a partir de análisis morfológicos que la distribución de dos subespecies de *Petunia axillaris*, subsp. *axillaris* y subsp. *parodii* se da al sur y al norte del río Negro, respectivamente. Turchetto et al. (2014) confirma esta distribución en una caracterización morfológica y genética con marcadores cloroplásticos y nucleares. En el complejo de subespecies de *Turnera sidoides*, Speranza et al. (2007) encontraron que la distribución de ciertos haplotipos cloroplásticos, independientemente de la subespecie, sigue una clara estructura geográfica; en particular para Uruguay los dos haplotipos presentes se encuentran separados por la cuchilla de Haedo. Posteriormente se encontraron cuatro clados a partir del análisis de haplotipos del territorio uruguayo, dos asociados a las sierras de la Cuchilla Grande y otros dos a la cuchilla de Haedo (Moreno et al., 2018). Jolochín (2016) estudió la variabilidad genética de *Eugenia uniflora* mediante un análisis biogeográfico y observó que las poblaciones de nuestro país se agrupan en dos clados principales, uno asociado a la región norte de la Cuchilla Grande y otro asociado al norte de la cuchilla de Haedo. Por su parte, Hernández (2019) encontró una distribución similar al analizar secuencias cloroplásticas de poblaciones de *Ilex paraguayensis* uruguayas. A pesar de ser modelos diferentes que no se relacionan filogenéticamente, los autores coinciden en que esta distribución estaría relacionada con la retracción y expansión de la distribución de las especies desde los refugios climáticos generados durante el Último Máximo Glacial (UMG) (Speranza et al., 2007; Turchetto et al., 2014; Jolochín, 2016;

Moreno *et al.*, 2018; Hernández, 2019). Los refugios climáticos son áreas que mantienen condiciones climáticas favorables para la supervivencia de poblaciones biológicas que ven su distribución restringida debido a condiciones climáticas regionales desfavorables (Dobrowski, 2011). Durante el UMG, las oscilaciones climáticas generaron el avance y retroceso de glaciares en los Andes, lo que devino en una serie de períodos de mayor humedad y calor alternados con períodos de frío y aridez en las zonas bajas del continente (Iriondo y Garcia, 1993). En estos períodos más secos, los valles y quebradas de los ríos y cerros habrían servido de refugio para especies adaptadas a climas más húmedos (Vuilleumier, 1971; Ab'Sáber, 1977). El hecho de que otras solanáceas, así como también otros complejos de especies, se subdividan como las papas silvestres sugiere que podrían ser los mismos factores que subyacen a esta distribución.

El análisis de los marcadores microsatélites reveló que los triploides no se separan genéticamente de las poblaciones de origen. Hawkes y Hjerting (1969) postularon que el origen de estos triploides podría ser autotriploide, en el sentido de cruzamiento intraespecífico, hipótesis que apoyan Tarn y Hawkes (1986) basados en la facilidad de hibridación y el nivel de producción de gametos $2n$ que observaron. Por otra parte, la cruzabilidad entre *S. chacoense* y *S. commersonii* ha sido reportada en hibridaciones dirigidas (Johnston y Hanneman, 1980, 1982) en general involucrando polen no reducido de la última, que permitiría sortear la barrera del EBN. Si bien se encontró evidencia de formación de polen no reducido en varios genotipos de la muestra (Amarillo *et al.*, 2019), el análisis genético de los genotipos triploides analizados no arrojó evidencia de si son producto del cruzamiento interespecífico entre cualquiera de los grupos principales, o de estos con *S. chacoense* u otra especie (Figura 4). Si bien se continúan analizando por diferentes enfoques para dilucidar su origen, se podría postular que surgen de la unión de un gameto reducido con un gameto $2n$ dentro de la misma población tal como proponen Hawkes y Hjerting (1969), probablemente escapando a la barrera del EBN, como fue reportado en los cruces entre *S. acaule* $4x$ (2EBN) x *S. commersonii* $2x$ (1EBN) que produjeron una progenie triploide (Masuelli y Camadro, 1997)

El análisis morfológico mostró una tendencia a que los triploides se agrupen en el centro de la distribución. Hawkes y Hjerting (1969) ya habían identificado por su morfología “anómala” individuos $3x$ de las dos especies principales en Uruguay. Los describen en comparación con individuos diploides como más robustos, con flores tenían la misma morfología de los diploides, aunque podían ser blancas o violetas. Bennett (1987) propone el concepto de nucleotipo como las condicio-

nes del ADN nuclear que afectan el fenotipo independientemente de la información codificada en él. Leal-Bertioli *et al.* (2017) encontraron que seis variedades de tetraploides de maní presentaban morfologías similares a pesar de venir de padres diploides distintos, similar a lo encontrado en el presente estudio con papas silvestres. Dado que esta similitud morfológica de los triploides no se constata en el análisis genético y que los genotipos 3x provienen de distintas regiones del país, se descarta que esta morfología se deba a un efecto genético o a un morfotipo asociado a una región particular, siendo más bien causa del efecto nucleotípico generado por el aumento del material genético en los núcleos celulares.

CONCLUSIONES

El presente trabajo contribuye al entendimiento de la composición y estructura del complejo de especies silvestres de papa de Uruguay, abordando la problemática con un enfoque integral y sistemático de su variabilidad morfológica y genética, y comparándolo con otros complejos de especies silvestres de la región.

Los resultados indican que las papas silvestres de Uruguay conforman 3 grupos genéticos que tienden a coincidir con los grupos morfológicos y de los cuales dos predominan cada uno en dos regiones distintas del territorio, delimitadas por la cuchilla de Haedo y el río Negro. Si bien es necesaria la caracterización de individuos del centro del país, así como la identificación de posibles zonas de contacto de los grupos genéticos observados, el grupo asociado al litoral norte se corresponde morfológicamente con las descripciones dadas para *S. malmeanum*, mientras que en el resto del país la morfología se ajusta a la descripción de *S. commersonii*. Esta distribución se condice con la encontrada en otros grupos de especies, tanto relacionados filogenéticamente como no, dejando entrever la influencia de factores externos en el moldeado de la biodiversidad regional. En cuanto a *S. chacoense*, son necesarios más muestreos para comprender su distribución en Uruguay.

Hasta el momento, el entendimiento sobre la ocurrencia de individuos triploides en poblaciones naturales de parientes silvestres de papa no nos permite separarlos de su origen geográfico. Si bien se agrupan morfológicamente, esto podía atribuirse a efectos nucleotípicos, ya que no se agrupan genéticamente. Entender su origen requiere de otros abordajes, que ya han resultado útiles en otros modelos como el análisis de marcadores cloroplásticos plastidiales (Speranza *et al.*,

2007; Turchetto *et al.*, 2014), o de genotipos segregantes de cruzamientos con accesiones ya caracterizadas.

RESUMEN

La papa *Solanum tuberosum* es el cultivo hortícola más importante del mundo y sus parientes silvestres han sido ampliamente usados en el mejoramiento del cultivo. Las papas silvestres *S. chacoense*, *S. commersonii* y *S. malmeanum* se distribuyen en Uruguay presentan interés agronómico por su resistencia al frío y a patógenos como *Ralstonia solanacearum*. La distribución y estructura genética de estas especies no ha sido estudiada sistemáticamente. Se conoce la riqueza clonal de las poblaciones de Uruguay y se ha postulado al Río Negro como límite entre dos grupos genéticos principales, pero aún no se ha determinado la estructura poblacional de estas especies. El objetivo es caracterizar mediante marcadores morfológicos y moleculares una selección de las accesiones colectadas sistemáticamente en todo Uruguay para esclarecer qué especies están presentes y cuál es la distribución geográfica de su variabilidad, y dilucidar el origen de los genotipos triploides identificados. Se utilizaron 30 descriptores morfológicos del Centro Internacional de la Papa en floración, fructificación y tuberización. Las medias estandarizadas se analizaron por correspondencias múltiples. Se analizó el perfil para 9 marcadores tipo microsatélite por coordenadas principales. Finalmente se analizó la correlación de los datos morfológicos y moleculares entre sí y con la localidad de cada genotipo. Los resultados tanto morfológicos como moleculares mostraron una marcada tendencia a formar dos grupos principales correlacionados. A su vez, en ambos análisis la variabilidad se correlaciona con el origen geográfico de los genotipos. No fue posible dilucidar el origen de los triploides, pero se observó un agrupamiento morfológico, probablemente por efectos nucleotípicos. La determinación de los grupos sugiere la presencia de dos especies que corresponderían a la descripción de *S. malmeanum* en Litoral Norte al oeste de la Cuchilla de Haedo y *S. commersonii* en el resto del país. También se determinaron dos genotipos *S. chacoense*, pero se necesitan más muestras para entender su distribución. Los patrones de distribución de la variabilidad genética corresponden con los de otras especies y se podrían relacionar con la geomorfología de la región.

BIBLIOGRAFÍA CONSULTADA

- Ab'Sáber AN (1977) Os dominios morfoclimaticos na America do Sul. Geomorfol Univ São Paulo 52:
- Abdi H, Valentin D (2007) Multiple Correspondence Analysis. En: Salkind N (ed) Encyclopedia of Measurement and Statistics. Thousand Oaks (CA)
- Amarillo A, Villaró F, Speranza P, Gaiero P (2019) Viabilidad de polen y producción de polen no reducido en parientes silvestres de la papa de Uruguay. Montevideo
- Andino Rossi M (2017) USO DE SOLANUM COMMERSONII Dun. EN EL MEJORAMIENTO GENÉTICO DE PAPA PARA RESISTENCIA A RALSTONIA SOLANACEARUM: caracterización de una retrocruza 3. Universidad de la República
- Ando T, Iida S, Kokubun H, *et al* (1995) Distribution of *Petunia axillaris* Sensu Lato in Uruguay as Revealed by Discriminant Analysis of the Live Plants. J Japanese Soc Hortic Science 64:381–391
- Balao F, Herrera J, Talavera S (2011) Phenotypic consequences of polyploidy and genome size at the microevolutionary scale: a multivariate morphological approach. New Phytol 192:256–265. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2011.03787.x>
- Bennett MD (1987) Variation in genomic form in plants and its ecological implications. New Phytol 106:177–200. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1987.tb04689.x>
- Berg RG Van Den, Jacobs MMJ (2007) Molecular Taxonomy. Elsevier B.V.
- Bohs L, Knapp S, Nee M, Spooner D Solanaceae Source. <http://solanaceaesource.org/>. Accessed 1 abr 2020
- Budin KZ, Gavrilenko T (1994) Genetic bases of remote hybridization in potato. Genetika-Moskva 1413–1422
- Camadro EL (2012) Relevance of the genetic structure of natural populations, and sampling and classification approaches for conservation and use of wild crop relatives: potato as an example. Botany 90:1065–1072. <https://doi.org/10.1139/b2012-090>

- Camadro EL, Carputo D, Peloquin SJ (2004) Substitutes for genome differentiation in tuber-bearing *Solanum*: Interspecific pollen-pistil incompatibility, nuclear-cytoplasmic male sterility, and endosperm. *Theor Appl Genet* 109:1369–1376.
<https://doi.org/10.1007/s00122-004-1753-2>
- Camadro EL, Erazzú LE, Maune JF, Bedogni MC (2012) A genetic approach to the species problem in wild potato. *Plant Biol* 14:543–554. <https://doi.org/10.1111/j.1438-8677.2012.00563.x>
- Cardi T, D’Ambrosio E, Consoli D, *et al* (1993) Production of somatic hybrids between frost-tolerant *Solanum commersonii* and *S. tuberosum*: characterization of hybrid plants. *Theor Appl Genet Int J Plant Breed Res* 87:193–200. <https://doi.org/10.1007/BF00223764>
- Carputo D, Alioto D, Aversano R, *et al* (2013) Genetic diversity among potato species as revealed by phenotypic resistances and SSR markers. *Plant Genet Resour Characterisation Util* 11:131–139. <https://doi.org/10.1017/S1479262112000500>
- Carputo D, Barone A, Frusciante L (2000) 2n gametes in the potato: Essential ingredients for breeding and germplasm transfer. *Theor Appl Genet* 101:805–813.
<https://doi.org/10.1007/s001220051547>
- Carputo D, Castaldi L, Caruso I, *et al* (2007) Resistance to frost and tuber soft rot in near-pentaploid *Solanum tuberosum*-*S. commersonii* hybrids. *Breed Sci* 57:145–151.
<https://doi.org/10.1270/jsbbs.57.145>
- Carputo D, Frusciante L, Monti L, *et al* (2002) Tuber quality and soft rot resistance of hybrids between *Solanum tuberosum* and the incongruent wild relative *S. commersonii*. *Am J Potato Res* 79:345–352. <https://doi.org/10.1007/BF02870172>
- Castañeda-Alvarez NP, De Haan S, Juarez H, *et al* (2015) Ex situ conservation priorities for the wild relatives of potato (*Solanum* L. section *petota*). *PLoS One* 10:1–19.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0122599>
- Chebataroff J (1942) La vegetación del Uruguay y sus relaciones fitogeográficas con el resto de América del Sur. *Rev del Inst Panam Geogr e Hist* 49–90
- Chebataroff J (1960) *Tierra Uruguaya*. Talleres Don Bosco 449

- Chen YKH, Palta JP, Bamberg JB (1999) Freezing tolerance and tuber production in selfed and backcross progenies derived from somatic hybrids between *Solanum tuberosum* L. and *S. commersonii* Dun. *Theor Appl Genet* 99:100–107. <https://doi.org/10.1007/s001220051213>
- Dal Molin LH (2017) Parentes silvestres da batata: áreas prioritárias para coleta no Brasil e variabilidade do germoplasma. Universidade Federal de Pelotas
- den Nijs TPM, Peloquin SJ (1977a) Polyploid evolution via 2n gametes. *Am Potato J* 54:377–386
- den Nijs TPM, Peloquin SJ (1977b) 2n gametes in potato species and their function in sexual polyploidization. *Euphytica* 26:585–600
- Dinges A, Gaiero P, Speranza P (2018) Assessing transferability of microsatellite markers for genetic diversity studies in wild potato species in Uruguay. Montevideo
- Dobrowski SZ (2011) A climatic basis for microrefugia: The influence of terrain on climate. *Glob Chang Biol* 17:1022–1035. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2486.2010.02263.x>
- FAO (2017) Producción Cultivos
- FAO (1997) The State of the World's Plant Genetic Resources. Rome, Italy
- FAO (2010) The Second Report on the State of the World's Plant Genetic Resources for Food and Agriculture. Rome, Italy
- Ferreira V, Pianzola MJ, Vilaró FL, *et al* (2017) Interspecific potato breeding lines display differential colonization patterns and induced defense responses after *Ralstonia solanacearum* infection. *Front Plant Sci* 8:1–14. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01424>
- Gaiero P, Mazzella C, Vilaró F, *et al* (2017) Pairing analysis and in situ Hybridisation reveal autopolyploid-like behaviour in *Solanum commersonii* × *S. tuberosum* (potato) interspecific hybrids. *Euphytica* 213:. <https://doi.org/10.1007/s10681-017-1922-4>
- Gaiero P, Speranza P, de Jong H (2018) Introgressive Hybridization in Potato Revealed by Novel Cytogenetic and Genomic Technologies. *Am J Potato Res* 95:607–621. <https://doi.org/10.1007/s12230-018-9669-6>
- Galván G, Franco-Fraguas L, Quirici, C. Santos L, *et al* (2007) *Solanum commersonii*: una especie

con gran potencial para el mejoramiento genético de papa por resistencia a *Ralstonia solanacearum*. En: Clausen A, Condón F, Berretta A (eds) Avances de Investigación en Recursos Genéticos en el Cono Sur II. PROCISUR, Montevideo

Gepts P (2006) Plant genetic resources conservation and utilization: The accomplishments and future of a societal insurance policy. *Crop Sci* 46:2278–2292.
<https://doi.org/10.2135/cropsci2006.03.0169gas>

Ghislain M, Núñez J, Del Rosario Herrera M, *et al* (2009) Robust and highly informative microsatellite-based genetic identity kit for potato. *Mol Breed* 23:377–388.
<https://doi.org/10.1007/s11032-008-9240-0>

Gómez R (2000) Guía para las caracterizaciones morfológicas básicas en colecciones de papas nativas. Lima, Perú

González M (2010) LA RESISTENCIA A LA MARCHITEZ BACTERIANA DE *Solanum commersonii* Dun. Y SU UTILIZACIÓN EN EL MEJORAMIENTO GENÉTICO DE PAPA. Universidad de la República

González M, Galván G, Siri M, *et al* (2013) Resistencia a la marchitez bacteriana de la papa en *Solanum commersonii* Dun. *Agrociencia Uruguay* 17:45–54.
<https://doi.org/10.2477/vol17iss1pp45-54>

Grela I (2004) Geografía florística de las especies arbóreas de Uruguay: propuesta para la delimitación de dendrofloras. *Grela, I.*:97

Hamrick JL, Godt MJW (1996) Effects of life history traits on genetic diversity in plant species. *Philos Trans R Soc B Biol Sci* 351:1291–1298. <https://doi.org/10.1098/rstb.1996.0112>

Hanneman RE (1999) The reproductive biology of the potato and its implication for breeding I

Hanneman RE (1994) Assignment of Endosperm Balance Numbers to the tuber-bearing numms and their close non-tuber-bearing relatives*. Kluwer Academic Publishers

Hawkes J, Hjerting J (1969) The potatoes of Argentina, Brazil, Paraguay and Uruguay. A biosystematic study. Clarendon Press, Oxford

Hawkes JG (1979) Genetic poverty of the potato in Europe. En: Broadening the Genetic Base of Crops. Wageningen, pp 19–27

- Hegarty M, Coate J, Sherman-Broyles S, *et al* (2013) Lessons from natural and artificial polyploids in higher plants. *Cytogenet Genome Res* 140:204–225. <https://doi.org/10.1159/000353361>
- Hernández Olveyra PA (2019) ESTRUCTURACIÓN GEOGRÁFICA DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA DE ILEX PARAGUARIENSIS St. Hil. EN EL URUGUAY. Facultad de Agronomía, Universidad de la República
- Hijmans RJ, Spooner DM (2001) Geographic distribution of wild potato species. *Am J Bot* 88:2101–12
- Huamán Z (2008) Descriptores morfológicos de la papa (*Solanum tuberosum* L.). Centro de Conservación de la Biodiversidad Agrícola de Tenerife (CCBAT), Tenerife
- Husson F, Lê S, Pagès J (2011) Exploratory multivariate analysis by example using R. *Explor Multivar Anal by Ex Using R* 40:1–225. <https://doi.org/10.1201/b10345>
- INIA (2017) Catálogo de cultivares hortícolas
- Iriondo MH, Garcia NO (1993) Climatic variations in the Argentine plains during the last 18,000 years. *Palaeogeogr Palaeoclimatol Palaeoecol* 101:209–220. [https://doi.org/10.1016/0031-0182\(93\)90013-9](https://doi.org/10.1016/0031-0182(93)90013-9)
- Jacobs MMJ, Smulders MJM, van den Berg RG, Vosman B (2011) What's in a name; genetic structure in *Solanum* section *Petota* studied using population-genetic tools. *BMC Evol Biol* 11:42. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-11-42>
- Jansky S (2006) Overcoming hybridization barriers in potato. *Plant Breed*. 125:1–12
- Jansky SH, Dawson J, Spooner DM (2015) How do we address the disconnect between genetic and morphological diversity in germplasm collections? *Am J Bot* 102:1213–1215. <https://doi.org/10.3732/ajb.1500203>
- Jansky SH, Dempewolf H, Camadro EL, *et al* (2013) A case for crop wild relative preservation and use in potato. *Crop Sci* 53:746–754. <https://doi.org/10.2135/cropsci2012.11.0627>
- Jansky SH, Peloquin SJ (2006) Advantages of wild diploid *Solanum* species over cultivated diploid relatives in potato breeding programs. *Genet Resour Crop Evol* 53:669–674. <https://doi.org/10.1007/s10722-004-2949-7>

- Johnston SA, Den Nijs TPM, Peloquin SJ, Hanneman RE (1980) The Significance of Genic Balance to Endosperm Development in Interspecific Crosses. *Theor Appl Genet* 57:5–9
- Johnston SA, Hanneman RE (1980) Support of the endosperm balance number hypothesis utilizing some tuber-bearing *Solanum* species. *Am Potato J* 57:7–14.
<https://doi.org/10.1007/BF02852750>
- Johnston SA, Hanneman RE (1982) Manipulations of Endosperm Balance Number Overcome Crossing Barriers between Diploid *Solanum* Species. *Am Assoc Adv Sci Stable* 217:446–448
- Jolochin Manorani G (2016) Análisis biogeográfico de la variabilidad genética de *Eugenia uniflora* L. en Uruguay
- Khoury CK, Bjorkman AD, Dempewolf H, *et al* (2014) Increasing homogeneity in global food supplies and the implications for food security. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111:4001–4006.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1313490111>
- Kim-Lee H, Moon JS, Hong YJ, *et al* (2005) Bacterial wilt resistance in the progenies of the fusion hybrids between haploid of potato and *Solanum commersonii*. *Am J Potato Res* 82:129–137.
<https://doi.org/10.1007/BF02853650>
- Knapp S, Bohs L, Nee M, Spooner DM (2004) Solanaceae - A model for linking genomics with biodiversity. *Comp Funct Genomics* 5:285–291. <https://doi.org/10.1002/cfg.393>
- Kokubun H, Ando T, Kohyama S, *et al* (1997) Distribution of Intermediate Forms of *Petunia axillaris* subsp. *axillaris* and subsp. *parodii* (Solanaceae) in Uruguay as Revealed by Discriminant Analysis. *Japanese Soc Plant Syst* 48:173–185
- Laferriere LT, Helgeson JP, Allen C (1999) Fertile *Solanum tuberosum*+*S. commersonii* somatic hybrids as sources of resistance to bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum*. *Theor Appl Genet* 98:1272–1278
- Lê S, Josse J, Husson F (2008) FactoMineR: An R Package for Multivariate Analysis. *J Stat Softw* 25:1–18. <https://doi.org/10.18637/jss.v025.i01>
- Leal-Bertioli SCM, Moretzsohn MC, Santos SP, *et al* (2017) Phenotypic effects of allotetraploidization of wild arachis and their implications for peanut domestication. *Am J*

Bot 104:379–388. <https://doi.org/10.3732/ajb.1600402>

Lobo M (2008) Importancia de los recursos genéticos de la agrobiodiversidad en el desarrollo de sistemas de producción sostenibles. *Rev Corpoica – Cienc y Tecnol Agropecu* 9:19–30

Loskutov IG (1999) Vavilov and his Institute. A history of the world collection of plant genetic resources in Russia. IPGRI, Rome, Italy

Lou Q, Iovene M, Spooner DM, *et al* (2010) Evolution of chromosome 6 of *Solanum* species revealed by comparative fluorescence in situ hybridization mapping. *Chromosoma* 119:435–442. <https://doi.org/10.1007/s00412-010-0269-6>

Mantel N (1967) The Detection of Disease Clustering and a Generalized Regression Approach. *Cancer Res* 27:209–220

Marks GE (1996) The origin and significance of intraspecific polyploidy: experimental evidence from *Solanum chacoense*. *Evolution (N Y)* 20:552–557.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005774>

Masuelli RW, Camadro EL (1997) Crossability relationships among wild potato species with different ploidy levels and Endosperm Balance Numbers (EBN). *Euphytica* 94:227–235.
<https://doi.org/10.1023/A:1002996131315>

Maxted N, Ford-Lloyd B V., Jury S, *et al* (2006) Towards a definition of a crop wild relative. *Biodivers Conserv* 15:2673–2685. <https://doi.org/10.1007/s10531-005-5409-6>

Maxted N, Guarino L (2004) Genetic erosion and genetic pollution of crop wild relatives. En: Ford-Lloyd B V., Dias SR, Bettencourt E (eds) Genetic erosion and genetic pollution assessment methodologies. PGR Forum Workshop 5, Terceira Island, Autonomous Region of the Azores, Portugal, pp 35–45

Micheletto S, Boland R, Huarte M (2000) Argentinian wild diploid *Solanum* species as sources of quantitative late blight resistance. *Theor Appl Genet* 101:902–906.
<https://doi.org/10.1007/s001220051560>

Moreno EMS, De Freitas LB, Speranza PR, Solís Neffa VG (2018) Impact of Pleistocene geoclimatic events on the genetic structure in mid-latitude South American plants: Insights from the

- phylogeography of *Turnera sidoides* complex (Passifloraceae, Turneroideae). *Bot J Linn Soc* 188:377–390. <https://doi.org/10.1093/botlinnean/boy062>
- Morton C (1976) A revision of the Argentine species of *Solanum*. Academia Nacional de Ciencias, Córdoba, República Argentina
- Narancio R, Zorrilla P, Robello C, *et al* (2013) Insights on gene expression response of a characterized resistant genotype of *Solanum commersonii* Dun. against *Ralstonia solanacearum*. *Eur J Plant Pathol* 136:823–835. <https://doi.org/10.1007/s10658-013-0210-y>
- Palta JP, Simon G (1993) Breeding Potential for Improvement of Freezing Stress Resistance: Genetic Separation of Freezing Tolerance, Freezing Avoidance and Capacity to Cold Acclimate. En: Li PH, Christersson L (eds) *Advances in Plant Cold Hardiness*, 1a edn. CRC Press, Boca Raton (FL), pp 299–310
- Peakall R, Smouse PE (2012) GenAEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. *Bioinformatics* 28:2537–2539
- Peakall R, Smouse PE (2006) GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Mol Ecol Notes* 6:288–295
- Pianzola MJ, Zarantonelli L, González G, *et al* (2005) Genetic, phytochemical and biochemical analyses as tools for biodiversity evaluation of wild accessions of *Solanum commersonii*. *Biochem Syst Ecol* 33:67–78
- Prieto A, Ispinzúa VN, Clausen AM (2016) Distribución y variabilidad morfológica de poblaciones de *Solanum commersonii* (Solanaceae) en la región pampeana de la Argentina. *Boletín la Soc Argentina Botánica* 51:59–71
- Quinn AA, Mok DWS, Peloquin SJ (1974) Distribution and significance of diplandroids among the diploid solanums. *Am Potato J* 51:16–21. <https://doi.org/10.1007/BF02852024>
- R Core Team (2018) R: A language and environment for statistical computing.
- Raker CM, Spooner DM (2002) Chilean tetraploid cultivated potato, *Solanum tuberosum*, is distinct from the Andean populations: Microsatellite data. *Crop Sci* 42:1451–1458. <https://doi.org/10.2135/cropsci2002.1451>

- Rigato S, González A, Huarte M (2001) Producción de Plántulas de Papa a Partir de Técnicas Combinadas de Micropropagación e Hidroponía para la Obtención de Semilla Prebásica. *Rev Latinoam la Papa* 12:110–120
- Sandro P, Rebollo MI, Gaiero P, *et al* (2016) Diseño de microsatélites para *Solanum commersonii* a partir de información genómica. *J Basic Appl Genet* 27:276
- Shah N, Wakabayashi T, Kawamura Y, *et al* (2020) Extreme genetic signatures of local adaptation during *Lotus japonicus* colonization of Japan. *Nat Commun* 11:1–15.
<https://doi.org/10.1038/s41467-019-14213-y>
- Silveira MM (2018) Mecanismos de poliplidización sexual en poblaciones naturales de *Solanum commersonii* Dun. de Uruguay. Facultad de Agronomía, Universidad de la República
- Siri MI (2010) Estudio genómico comparativo de las cepas de *Ralstonia solanacearum* causantes de la marchitez bacteriana de la papa en Uruguay. Universidad de la República
- Siri MI, Galván GA, Quirici L, *et al* (2009) Molecular marker diversity and bacterial wilt resistance in wild *Solanum commersonii* accessions from Uruguay. *Euphytica* 165:371–382
- Siri MI, Villanueva P, Pianzola MJ, *et al* (2005) In vitro antimicrobial activity of different accessions of *Solanum commersonii* Dun. from Uruguay. *Potato Res* 47:127–138
- Speranza PR, Seijo JG, Grela IA, Solís Neffa VG (2007) Chloroplast DNA variation in the *Turnera sidoides* L. complex (Turneraceae): Biogeographical implications. *J Biogeogr* 34:427–436.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2699.2006.01622.x>
- Spooner D, Ghislain M, Simon R, *et al* (2014) Systematics, Diversity, Genetics, and Evolution of Wild and Cultivated Potatoes. *Bot Rev* 80:283–383. <https://doi.org/10.1007/s12229-014-9146-y>
- Stevenson W, Loria R, Franc G, Weingartner D (2001) *Compendium of potato diseases*, 2a edn. American Phytopathological Society Press, St. Paul, USA
- Tal M (1980) Physiology of Polyploids. *Polyploidy* 61–75. https://doi.org/10.1007/978-1-4613-3069-1_4
- Tarn TR, Hawkes JG (1986) Cytogenetic studies and the occurrence of triploidy in the wild potato

species *Solanum commersonii* D un. *Euphytica* 35:293–302.

<https://doi.org/10.1007/BF00028567>

Tozzini AC, Ceriani MF, Saladrigas MV, Hopp HE (1991) Extreme resistance to infection by potato virus X in genotypes of wild tuber-bearing *Solanum* species. *Potato Res* 34:317–324.

<https://doi.org/10.1007/BF02360505>

Turchetto C, Fagundes NJR, Segatto ALA, *et al* (2014) Diversification in the south american pampas: The genetic and morphological variation of the widespread *petunia axillaris* complex (solanaceae). *Mol Ecol* 23:374–389. <https://doi.org/10.1111/mec.12632>

Vaio M, Mazzella C, Porro V, *et al* (2007) Nuclear DNA content variation in allopolyploid species and synthetic hybrids of the grass genus *Paspalum*. *Plant Syst Evol* 265:109–121

van Buuren S, Groothuis-Oudshoorn K (2011) mice: Multivariate Imputation by Chained Equations in R. *J Stat Softw* 45:1–67

Vavilov NI (1922) The law of Homologous Series in Variation. *J Genet* 12:47–89.

<https://doi.org/10.1007/BF02983073>

Vuilleumier BS (1971) Pleistocene Changes in the Fauna and Flora of South America. *Am Assoc Adv Sci Stable* 173:771–780

Wale S, Platt H, Cattlin N (2008) *Diseases, Pests and Disorders of Potatoes: A Color Handbook*. Elsevier, Florida, USA

Wang F, Li F, Wang J, *et al* (2011) Genetic Diversity of the Selected 64 Potato Germplasms Revealed by AFLP Markers. *Mol Plant Breed* 2:22–29.

<https://doi.org/10.5376/mpb.2011.02.0004>

Warschefsky E, Varma Penmetsa R, Cook DR, Von Wettberg EJB (2014) Back to the wilds: Tapping evolutionary adaptations for resilient crops through systematic hybridization with crop wild relatives. *Am J Bot* 101:1791–1800. <https://doi.org/10.3732/ajb.1400116>

ANEXOS

Tabla 1 — Accesiones seleccionadas para la caracterización, con su origen geográfico y ploidía.

Accesión	Departamento	Región	Latitud	Longitud	Ploidía
A11P1	Artigas	NO	-30,48	-57,65	2x
A12P1	Artigas	NO	-30,67	-57,69	2x
A2P3	Artigas	NO	-30,65	-56,43	2x
A3P2	Artigas	NO	-30,45	-56,55	2x
A7P2	Artigas	NO	-30,46	-57,41	2x
A8P1	Artigas	NO	-30,36	-57,49	2x
A9P2	Artigas	NO	-30,29	-57,61	3x
C10P1	Colonia	SO	-34,22	-57,88	3x
C11P1	Colonia	SO	-34,4	-57,62	2x
C12P1	Colonia	SO	-34,45	-57,77	2x
C14P1	Colonia	SO	-34,45	-57,77	2x
C2P2	Colonia	SO	-34,26	-57,28	2x
C4P2	Colonia	SO	-34,24	-57,39	2x
C6P1	Colonia	SO	-34,19	-57,43	2x
C7P2	Colonia	SO	-34,32	-57,45	2x
C9P1	Colonia	SO	-34,42	-57,25	2x
Ca1P1	Canelones	SE	-34,79	-55,89	2x
CL1P1	Cerro Largo	SE	-32,3	-54,78	2x
CL2P1	Cerro Largo	SE	-32,7	-54,21	2x
L4P3	Lavalleja	SE	-34,43	-55,45	2x
L5P1	Lavalleja	SE	-34,42	-55,37	2x
L7P1	Lavalleja	SE	-34,32	-55,03	2x
L9P1	Lavalleja	SE	-34,07	-54,79	2x
M10P8	Maldonado	SE	-34,84	-55,31	2x
M1P29	Maldonado	SE	-34,82	-55,32	2x
M3P8	Maldonado	SE	-34,83	-54,64	3x
M6P15	Maldonado	SE	-34,84	-54,65	2x
M6P6	Maldonado	SE	-34,84	-55,29	2x
Mo1P29	Montevideo	SE	-34,84	-56,4	2x
P1P1	Paysandú	NO	-32,03	-57,33	3x
P2P1	Paysandú	NO	-32,02	-57,38	3x
P2P2	Paysandú	NO	-32,02	-57,38	3x
P3P1	Paysandú	NO	-32,43	-58,09	2x
R10P1	Rivera	NE	-32,01	-54,84	2x
R11P1	Rivera	NE	-31,31	-55,85	2x
R1P1	Rivera	NE	-31,16	-55,87	2x
R2P1	Rivera	NE	-31,2	-55,9	2x
R4P1	Rivera	NE	-31,15	-55,65	2x
R7P1	Rivera	NE	-31,31	-55,27	2x
R8P1	Rivera	NE	-31,66	-54,83	2x
RN2P1	Río Negro	NO	-32,64	-58,15	2x

RN3P1	Río Negro	NO	-32,6	-58,09	2x
RN4P1	Río Negro	NO	-32,71	-57,99	2x
RN5P2	Río Negro	NO	-33,1	-58,09	2x
RN7P1	Río Negro	NO	-33,16	-58,36	2x
RN9P2	Río Negro	NO	-33,24	-58,04	2x
Ro1P1	Rocha	SE	-34,07	-54,41	2x
Ro2P1	Rocha	SE	-34,58	-54,12	3x
Ro3P1	Rocha	SE	-34,5	-54,3	2x
S1P12	Salto	NO	-31,46	-58,02	2x
S31P1	Salto	NO	-31,39	-57,71	2x
S32P1	Salto	NO	-31,38	-57,75	2x
S35P1	Salto	NO	-31,42	-58	3x
S36P1	Salto	NO	-31,45	-58,01	2x
S38P1	Salto	NO	-31,27	-57,91	2x
S39P1	Salto	NO	-31,3	-57,87	3x
S40P1	Salto	NO	-30,79	-57,78	2x
S41P1	Salto	NO	-30,95	-57,52	3x
S42P1	Salto	NO	-30,89	-57,6	2x
S43P2	Salto	NO	-31,07	-57,86	2x
S5P3	Salto	NO	-31,22	-57,09	3x
SJ1P1	San José	SO	-34,39	-56,61	2x
SJ2P1	San José	SO	-34,72	-56,47	2x
SJ3P1	San José	SO	-34,59	-56,54	2x
So1P1	Soriano	SO	-33,87	-57,39	2x
T1P1	Tacuarembó	NE	-31,58	-55,76	2x
T3P2	Tacuarembó	NE	-31,83	-56,17	3x
T5P1	Tacuarembó	NE	-31,66	-56,12	2x
T7P1	Tacuarembó	NE	-31,83	-55,59	2x
TyT1P1	Treinta y Tres	SE	-32,91	-54,29	2x
TyT2P1	Treinta y Tres	SE	-33,26	-54,4	2x
TyT6P1	Treinta y Tres	SE	-33,03	-54,41	2x
TUS2CHC5	Tucumán, ARG	TU	-	-	2x
TUS7CHC1	Tucumán, ARG	TU	-	-	2x

Tabla 2 — Descriptores morfológicos utilizados en la caracterización y sus estados.

Caracteres	Estados
Hábito de Crecimiento (Hcrec)	1-Erecto
	2-Semi-erecto
	3-Decumbente
	4-Postrado
	5-Semi-arrosetado
	6-Arrosetado
Color de Tallo (Cstem)	1 - Verde

	2 - Mayormente verde
	3 - Verde con muchas manchas pigmentadas
	4 - Pigmentado con muchas manchas verdes
	5 - Mayormente pigmentado
	7 - Morado
Grado de Pubescencia (Pub)	1- Glabra
	3- Escasa
	5- Intermedia
	7- Abundante
Número de pares de folíolos laterales primarios (NFP)	2
	3
	4
	5
Número de Pares de Inter-hojuelas sobre el Raquis Principal (NIHR)	0
	1
	2
	3
	4
	5
	6
	8
Número de Pares de Folíolos Laterales Secundarios sobre los Peciolulos (NIHP)	0
	1
	2
	3
	4
Sobre posición de folíolos (Sobr)	1- Muy separados (> 2 mm de separación)
	3- Separados (1-2 mm de separación)
	5- Unidos
Forma del folíolo terminal (FrmFT)	1- Anchamente elíptico (Tla/Tll cerca de 0.5 y Tll/Tlw cerca de 1.5)
	2- Elíptico (Tla/Tll cerca de 0.5 y Tll/Tlw >=2)
	6- Obovado (Tla/Tll cerca de 0.3 y Tll/Tlw >=2)
Forma del ápice del Folíolo Terminal (FAFT)	1- Con acumen largo (> 2mm)
	3- Con acumen corto (1-2 mm)
	5- Obtuso
	7- Redondeado
Forma de la Base del Folíolo Terminal (FBFT)	1- Cuneado
	2- Cuneado y decurrente (con alas)
	3- Truncado

	5- Redondeado
	9- Desigual o asimétrico
Forma de la corola (Fflo)	1- Estrellada (Cl/Cw \geq 1.2)
	3- Semi-estrellada (Cl/Cw entre 0.9 y 1.1)
	5- Pentagonal (Cl/Cw entre 0.5 y 0.8)
Color predominante de la corola (Cflo)	1- Blanco
	6- Lila
	7- Púrpura
	8- Violeta
Intensidad del color predominante (CfloIn)	1- Claro
	2- Intermedio
	3- Oscuro
Color secundario de la corola (CfloB)	0- Ausente
	1- Blanco
	6- Lila
	7- Púrpura
	8- Violeta
Intensidad del color secundario (CfloBin)	0- Ausente
	1- Claro
	2- Intermedio
	3- Oscuro
Distribución del Color secundario de la corola (DCfloB)	0- Ausente
	2- Acumen abaxial
	3- Acumen ambas caras
	4- En estrella adaxial
	5- Bandas adaxiales
	6- Bandas abaxiales
	7- Bandas en ambas caras
	8- Manchas salpicadas
Color del Cáliz (Ccal)	1 - Verde
	2 - Mayormente verde
	3 - Verde con muchas manchas pigmentadas
	4 - Pigmentado con muchas manchas verdes
	5 - Mayormente pigmentado
Color de Fruto (Cfru)	1- Verde
	2- Verde con pocas manchas blancas
	3- Verde con bandas blancas
	4- Verde con abundantes manchas blancas
	7- Predominantemente pigmentado
Forma del fruto (Ffru)	1- Globular (Fl/Fd cerca de 1)

	2- Globular mucronado
	3- Ovoide (Fl/Fd cerca de 1.5)
	4- Ovoide mucronado
	5- Cónica (Fl/Fd=2)
	6- Cónica alargado (Fl/Fd >2)
	7- Piriforme (Fl/Fd cerca de 2 y en forma de pera)
Presencia de hendidura en la unión de los carpelos (Hend)	0- No 1- Si
Cantidad de carpelos (Cancar)	0- Presencia de 2 carpelos 1- Presencia de más o menos de 2 carpelos
Tamaño del tubérculo (Ttub)	1- Hasta 2 cm 2- De 2 a 3 cm 3- De 3 a 4 cm 4- Más de 4 cm
Color Predominante de la Piel del Tubérculo (Ctub)	3- Anaranjado 4- Marrón 8- Morado
Intensidad del Color Predominante de la Piel del Tubérculo (Ctubin)	1- Claro 2- Intermedio 3- Oscuro
Color Secundario de la Piel del Tubérculo (CtubB)	0- Ausente 4- Marrón 5- Rosado 7- Morado rojizo 8- Morado 9- Morado violeta
Distribución del Color Secundario de la Piel del Tubérculo (DctubB)	0- Ausente 1- Solamente en los ojos 4- En manchas dispersas 6- En manchas salpicadas 7- Muy pocas manchas
Forma del tubérculo: forma general (Ftub)	1- Comprimido, el eje mayor es más corto. 2- Redondo, el contorno es casi circular. 3- Ovado, parecido a la sección longitudinal de un huevo. La parte más ancha está dentro del 1/3 de la distancia desde el extremo de inserción del estolón. 4- Obovado, inversamente ovoide con la parte más ancha dentro del 1/3 de la distancia desde el extremo apical donde están los ojos. 5- Elíptico, con aproximadamente el mismo ancho a

distancias iguales desde los extremos que son ligeramente agudos.

6- Oblongo, con un contorno casi rectangular que tiene los lados casi paralelos y las esquinas redondeadas. La proporción del largo y el ancho debe ser más de 1.5.

7- Oblongo alargado, la proporción del largo y el ancho debe ser cercana a 2.

Forma del tubérculo: formas raras (FtubB)	0- Ausente	
	1- Aplanado	
	2- Clavado	
	4- Fusiforme	
	5- Falcado	
	8- Concertinoide	
	9- Tuberosado	
	Color Predominante de la Carne del Tubérculo (Cctub)	1- Blanco
		2- Crema
3- Amarillo claro		
4- Amarillo		
5- Amarillo oscuro		
Profundidad de los ojos (Deye)	1- Protuberante	
	3- Superficial (<2mm)	
	5- Medio (2-4mm)	

Tabla 3 — Matriz de mdias ajustadas por genotipo de la caracterización morfológica. La codificación de las categorías se detalla en la tabla 2 de los anexos y los porcentajes obtenidos para cada categoría de cada variable en la tabla 2. Los guiones indican falta de registro

Genotipo	Cancar	Ccal	Cctub	Cflo	CfloB	CfloBin	CfloIn	Cfru	Cstem	Ctub	CtubB	Ctubin	DCfloB	DCtubB	Deye	FAFT	FBFT	Fflo	Ffru	FrmFT	Ftub	FtubB	Hcrec	Hend	NFP	NIHP	NIHR	Pub	Sobr	Ttub
A11P1	0	1	3	1	0	0	0	2	1	4	0	2	1	0	3	4	2	1	3	1	4	2	5	1	3	0	1	1	1	1
A12P1	-	1	4	1	0	0	0	-	1	4	0	2	2	0	3	5	2	1	-	1	3	3	6	-	3	0	1	4	3	1
A2P3	0	1	3	3	0	0	0	1	1	4	0	1	1	0	3	4	2	1	1	1	3	0	4	0	3	0	2	3	2	2
A3P2	-	2	2	2	2	6	6	-	1	4	0	2	1	0	3	6	2	3	-	1	2	1	2	-	2	0	0	3	1	1
A7P2	0	1	2	1	0	0	0	1	1	4	0	2	1	0	3	3	2	1	3	2	3	3	3	1	4	0	2	3	1	1
A8P1	0	2	3	2	3	5	5	1	1	4	0	1	1	0	3	5	3	1	4	1	2	1	4	0	3	0	1	4	3	1
A9P2	-	-	3	-	-	-	-	-	1	4	0	2	-	0	3	5	2	-	-	1	2	1	3	-	3	0	2	2	2	1
C10P1	0	1	2	2	3	5	7	3	2	4	0	1	1	0	3	3	7	6	4	1	4	0	3	0	3	0	0	2	1	4
C11P1	0	1	3	1	3	6	7	1	2	4	4	1	1	2	2	7	2	6	3	1	3	0	3	0	2	0	0	6	1	2

C12P1	0	1	3	1	3	6	6	2	1	4	0	1	1	0	2	5	2	4	4	1	6	4	2	0	3	0	1	6	2	3	
C14P1	0	1	3	1	2	6	7	1	1	4	0	1	1	0	3	6	2	1	5	1	3	1	3	1	4	0	4	7	1	2	
C2P2	0	1	3	1	3	6	6	1	2	4	0	1	1	0	3	5	1	4	1	1	2	0	2	1	2	0	1	4	1	1	
C4P2	-	1	3	1	2	6	7	-	2	4	5	1	1	3	2	2	4	7	-	2	4	5	3	-	3	0	3	7	1	2	
C6P1	1	1	3	3	3	2	7	1	3	4	0	1	1	0	5	4	1	6	3	1	5	1	3	0	2	0	2	4	1	4	
C7P2	0	1	3	2	2	6	7	1	2	4	0	1	1	0	3	5	1	6	3	2	5	0	3	1	3	1	1	5	1	2	
C9P1	0	2	4	1	3	2	6	4	1	4	3	2	1	1	4	6	4	6	2	1	4	1	3	1	3	0	1	4	2	3	
Ca1P1	0	1	-	2	3	7	7	1	7	-	-	-	1	-	-	3	9	6	4	2	-	-	2	0	2	0	1	6	2	-	
CL1P1	0	1	3	2	3	6	7	1	2	4	5	1	1	3	3	6	1	6	3	1	3	2	4	0	2	0	1	3	1	2	
CL2P1	0	1	3	2	3	6	7	1	5	4	0	1	1	0	3	5	1	6	4	2	4	0	5	1	4	0	4	3	1	2	
L4P3	0	2	3	2	3	6	8	1	2	4	0	1	2	0	3	7	6	6	4	1	4	6	3	0	3	0	2	5	2	3	
L5P1	-	1	4	1	3	6	7	-	2	4	0	2	1	0	4	6	9	6	-	2	4	2	3	-	3	0	0	5	2	2	
L7P1	0	1	3	2	2	5	7	1	2	4	0	1	1	0	3	5	1	6	7	1	4	4	5	1	3	0	1	3	3	2	
L9P1	-	1	2	2	2	6	8	-	2	4	3	2	1	2	3	6	7	4	-	2	3	6	5	-	3	0	2	4	2	3	
M10P8	0	1	3	1	2	6	7	1	2	4	0	1	2	0	3	7	9	6	5	1	3	1	2	1	3	0	2	6	1	4	
M1P29	-	1	3	3	0	0	0	-	2	4	0	2	1	0	2	5	2	1	-	1	2	4	3	-	4	0	1	3	2	1	
M3P8	0	2	3	1	3	7	6	1	3	4	6	1	1	3	3	4	4	1	1	1	2	1	5	0	4	0	1	3	4	1	
M6P15	-	-	3	-	-	-	-	-	1	4	0	2	-	0	2	4	2	-	-	1	3	1	3	-	3	0	1	3	1	1	
M6P6	0	1	-	1	3	6	7	1	1	-	-	-	1	-	-	7	1	1	3	1	-	-	4	1	3	0	1	3	1	-	
Mo1P2																															
9	0	2	3	2	0	0	0	5	2	4	2	1	1	1	3	3	5	1	1	1	1	0	2	0	4	0	3	1	2	2	
P1P1	0	2	3	1	3	7	6	1	3	4	0	2	1	0	4	4	1	1	4	1	4	1	5	1	3	0	2	4	1	2	
P2P1	-	-	4	-	-	-	-	-	1	4	0	1	-	0	3	2	7	-	-	1	3	2	6	-	2	0	2	4	2	1	
P2P2	-	1	3	2	0	0	0	-	2	4	0	1	1	0	2	5	9	1	-	1	3	4	4	-	3	0	3	3	1	2	
P3P1	0	1	3	2	0	0	0	1	2	4	0	2	1	0	3	5	2	1	4	2	2	8	2	1	3	0	1	4	1	1	
R10P1	0	1	3	1	3	6	6	1	3	4	0	1	2	0	3	5	4	6	3	1	4	0	2	0	3	0	1	3	2	4	
R11P1	0	1	3	3	2	6	7	2	2	4	0	2	1	0	3	2	4	6	4	2	4	4	5	1	3	0	2	3	1	2	
R1P1	1	1	3	1	1	2	2	2	3	4	3	1	1	1	3	2	1	1	2	2	4	2	2	1	3	0	1	1	1	4	
R2P1	0	1	4	2	2	7	7	1	2	4	0	1	1	0	3	3	1	1	4	2	3	3	4	0	4	0	3	2	1	1	
R4P1	-	1	3	2	1	3	1	-	2	4	0	1	1	0	3	3	7	6	-	1	3	0	3	-	3	0	1	4	2	2	
R7P2	0	1	3	3	2	4	1	1	2	4	5	1	1	2	1	7	2	8	6	1	2	0	4	1	2	0	1	4	1	4	
R8P1	0	1	3	2	1	6	8	1	3	4	0	1	2	0	3	6	9	6	3	2	2	0	2	1	3	0	0	3	1	2	
RN2P1	-	-	4	-	-	-	-	-	1	4	0	2	0	0	4	4	2	-	-	1	4	1	4	-	3	1	3	3	1	2	
RN3P1	-	1	2	2	1	6	4	-	1	4	0	2	1	0	3	4	2	1	-	3	2	1	2	-	4	3	4	4	3	1	
RN4P1	-	1	3	1	0	0	0	-	1	4	0	2	1	0	2	3	2	1	-	1	4	4	3	-	3	0	3	3	1	3	
RN5P2	-	1	3	2	2	6	6	-	1	4	0	2	1	0	3	5	2	1	-	2	3	1	5	-	4	1	4	3	1	1	
RN7P1	1	3	3	2	0	0	0	4	2	4	6	2	1	2	3	2	3	1	1	1	1	3	3	1	4	0	3	2	2	2	
RN9P2	-	1	3	1	3	6	7	-	2	4	0	1	1	0	3	4	2	4	-	2	3	3	5	-	4	0	3	4	1	1	
Ro1P1	0	1	-	2	1	7	3	1	2	-	-	-	1	-	-	2	7	4	4	2	-	-	3	0	3	0	1	6	1	-	
Ro2P1	0	3	3	1	3	6	6	3	1	4	0	1	1	0	3	5	1	1	3	1	2	0	3	1	3	0	2	5	3	1	
Ro3P1	0	1	3	2	2	6	8	1	2	4	0	2	1	0	4	6	2	3	3	1	3	1	3	1	3	0	1	5	1	1	
S1P12	-	-	2	-	-	-	-	-	1	4	0	1	-	0	3	3	2	-	-	1	3	1	4	-	4	0	1	3	2	1	
S31P1	-	2	3	2	1	4	3	-	1	4	0	2	1	0	3	3	2	1	-	1	2	1	4	-	3	0	1	4	1	1	
S32P1	0	2	3	2	2	5	4	2	2	4	0	2	1	0	3	4	2	1	1	2	2	0	4	1	4	0	2	4	1	1	
S35P1	-	-	3	-	-	-	-	-	2	4	0	2	-	0	3	1	2	-	-	1	2	3	4	-	2	0	0	5	1	1	
S36P1	-	1	3	1	0	4	3	-	1	4	0	2	1	0	3	4	2	1	-	1	4	1	5	-	4	0	5	4	1	2	
S38P1	0	1	3	2	2	6	4	2	1	4	0	2	1	0	3	3	2	1	3	2	2	0	3	0	4	0	2	2	1	1	

S39P1	0	1	3	2	2	6	4	1	3	4	3	2	1	1	3	3	3	1	3	1	4	1	2	1	3	2	3	5	2	3
S40P1	-	1	2	3	0	0	0	-	1	4	0	1	1	0	3	3	2	1	-	1	2	0	3	-	3	0	1	3	1	2
S41P1	0	3	3	2	2	7	6	2	3	4	0	1	1	0	3	4	2	1	4	1	2	1	4	1	3	0	2	3	1	2
S42P1	-	1	2	3	0	0	0	-	1	4	0	3	1	0	3	3	2	1	-	2	4	0	5	-	4	0	1	3	1	2
S43P1	0	2	4	2	1	6	4	3	1	4	0	2	1	0	3	4	7	1	4	2	2	0	6	1	4	1	3	2	1	1
S5P3	-	1	2	2	0	0	0	-	1	4	0	2	1	0	3	2	1	1	-	1	4	3	5	-	3	0	0	4	1	2
SJ1P1	0	1	3	1	3	6	7	1	3	4	5	2	1	3	2	4	1	6	6	2	2	9	4	0	3	0	1	4	1	2
SJ2P1	1	1	3	1	3	6	6	1	2	4	4	2	1	3	3	5	9	6	4	1	4	1	3	0	4	1	3	7	1	3
SJ3P1	1	1	4	3	3	6	7	2	5	4	7	1	1	5	3	4	2	6	4	2	3	6	1	0	3	0	1	2	1	2
So1P1	0	2	4	1	2	6	7	1	3	8	4	2	4	4	3	6	4	6	4	2	3	7	3	1	4	0	2	6	1	2
T1P1	0	1	3	3	2	3	1	1	2	4	5	1	1	2	3	5	3	6	4	1	4	4	4	0	3	0	1	3	2	4
T3P2	-	1	4	3	2	8	6	-	3	4	3	1	1	2	2	3	4	1	-	1	3	2	4	-	3	0	2	6	2	3
T5P1	0	1	3	2	2	6	6	3	2	4	5	1	1	3	3	6	9	6	5	1	4	2	5	0	3	0	2	4	2	2
T7P2	-	1	3	2	2	7	7	-	2	4	0	1	1	0	3	6	7	1	-	1	4	3	4	-	3	0	2	3	1	2
Tus2chc5	0	-	3	-	-	-	-	4	3	4	4	1	-	2	3	1	1	-	1	2	2	0	3	0	4	0	3	1	1	2
Tus7chc1	0	5	3	2	0	0	0	4	2	4	4	2	1	2	3	1	6	1	1	2	2	0	2	0	4	2	4	1	1	1
TyT1P1	0	1	4	2	2	6	7	2	2	4	0	1	1	0	3	5	2	4	3	1	3	1	3	0	3	0	0	5	1	2
TyT2P1	0	2	3	2	2	4	3	1	3	4	7	1	1	4	3	5	7	6	2	2	3	1	3	1	4	0	2	5	2	3
TyT6P1	0	1	2	1	3	6	7	2	2	4	3	1	1	2	3	7	1	6	7	1	4	6	2	0	3	0	2	3	2	3

Tabla 4 — Descripción de cada conglomerado según las categorías de las variables. La columna **Cla/Mod** indica el porcentaje de genotipos con dicha categoría que están en el conglomerado. La columna **Mod/Cla** indica el porcentaje de genotipos del conglomerado que presentan dicha categoría. La columna **Global** indica el porcentaje de dicha categoría en la población. La columna **p.value** testea que la proporción de dicha categoría en el conglomerado sea mayor que en la población, sólo incluye las categorías con p-value menores a 0.05.

Conglomerado 1

Categorías	Cla/Mod	Mod/Cla	Global	p.value	v.test
Pub=Pub_1	60,00	75,00	8,06	0,00	3,28
Ffru=Ffru_1	28,57	100,00	22,58	0,00	3,12
Ftub=Ftub_1	100,00	50,00	3,23	0,00	2,95
FAFT=FAFT_1	100,00	50,00	3,23	0,00	2,95
DCtubB=DCtubB_3	37,50	75,00	12,90	0,01	2,77
NFP=NFP_3	19,05	100,00	33,87	0,01	2,55
NIHR=NIHR_4	30,00	75,00	16,13	0,01	2,51
Cfru=Cfru_4	30,00	75,00	16,13	0,01	2,51
CfloIn=CfloIn_1	25,00	75,00	19,35	0,02	2,30
CfloBlIn=CfloBlIn_1	25,00	75,00	19,35	0,02	2,30

CtubB=CtubB_4	40,00	50,00	8,06	0,03	2,16
CfloB=CfloB_1	21,43	75,00	22,58	0,03	2,11
Cfru=Cfru_1	0,00	0,00	51,61	0,05	-1,97
NFP=NFP_2	0,00	0,00	54,84	0,04	-2,09
CtubB=CtubB_1	0,00	0,00	66,13	0,01	-2,55
DCtubB=DCtubB_1	0,00	0,00	67,74	0,01	-2,62
Ccal=Ccal_1	0,00	0,00	77,42	0,00	-3,12

Conglomerado 2

Categorías	Cla/Mod	Mod/Cla	Global	p.value	v.test
Fflo=Fflo_1	75,00	95,45	45,16	0,00	6,08
Cstem=Cstem_1	81,82	81,82	35,48	0,00	5,61
FBFT=FBFT_2	70,37	86,36	43,55	0,00	5,04
CtubB=CtubB_1	53,66	100,00	66,13	0,00	4,49
Ttub=Ttub_1	72,73	72,73	35,48	0,00	4,43
DCtubB=DCtubB_1	52,38	100,00	67,74	0,00	4,33
CfloB=CfloB_1	78,57	50,00	22,58	0,00	3,64
CtubIn=CtubIn_2	57,14	72,73	45,16	0,00	3,16
CfloIn=CfloIn_1	75,00	40,91	19,35	0,00	2,99
CfloBIn=CfloBIn_1	75,00	40,91	19,35	0,00	2,99
FAFT=FAFT_3	72,73	36,36	17,74	0,01	2,66
CfloIn=CfloIn_5	100,00	18,18	6,45	0,01	2,48
FAFT=FAFT_4	66,67	36,36	19,35	0,02	2,35
CCtub=CCtub_1	75,00	27,27	12,90	0,02	2,30
Ftub=Ftub_2	58,82	45,45	27,42	0,02	2,24
FAFT=FAFT_6	9,09	4,55	17,74	0,05	-2,00
CCtub=CCtub_2	27,27	54,55	70,97	0,04	-2,01
CtubB=CtubB_5	0,00	0,00	11,29	0,04	-2,08
FBFT=FBFT_1	8,33	4,55	19,35	0,03	-2,19
Ttub=Ttub_2	19,23	22,73	41,94	0,03	-2,23
DCtubB=DCtubB_3	0,00	0,00	12,90	0,02	-2,28
Cstem=Cstem_3	0,00	0,00	12,90	0,02	-2,28
CfloB=CfloB_4	10,53	9,09	30,65	0,01	-2,75
CfloBIn=CfloBIn_6	18,75	27,27	51,61	0,01	-2,78
CfloIn=CfloIn_8	13,04	13,64	37,10	0,00	-2,83
Cstem=Cstem_2	13,79	18,18	46,77	0,00	-3,32
CtubIn=CtubIn_1	15,15	22,73	53,23	0,00	-3,51
Fflo=Fflo_4	0,00	0,00	38,71	0,00	-4,98

Conglomerado 3

Categorías	Cla/Mod	Mod/Cla	Global	p.value	v.test
Fflo=Fflo_4	95,83	63,89	38,71	0,00	4,98
CfloIn=CfloIn_8	86,96	55,56	37,10	0,00	3,55
CtubIn=CtubIn_1	78,79	72,22	53,23	0,00	3,47
CfloB=CfloB_4	89,47	47,22	30,65	0,00	3,36
CfloBIn=CfloBIn_6	78,13	69,44	51,61	0,00	3,25
Cfru=Cfru_1	75,00	66,67	51,61	0,01	2,73
Cstem=Cstem_2	75,86	61,11	46,77	0,01	2,61
Ccal=Ccal_1	66,67	88,89	77,42	0,01	2,43
FAFT=FAFT_6	90,91	27,78	17,74	0,02	2,42
CtubB=CtubB_5	100,00	19,44	11,29	0,02	2,39
Ttub=Ttub_4	100,00	16,67	9,68	0,03	2,15
Pub=Pub_6	100,00	16,67	9,68	0,03	2,15
Pub=Pub_5	100,00	16,67	9,68	0,03	2,15
Fflo=Fflo_3	100,00	16,67	9,68	0,03	2,15
FBFT=FBFT_8	100,00	16,67	9,68	0,03	2,15
FAFT=FAFT_7	100,00	16,67	9,68	0,03	2,15
DCtubB=DCtubB_4	100,00	16,67	9,68	0,03	2,15
NFP=NFP_2	70,59	66,67	54,84	0,03	2,14
CfloIn=CfloIn_5	0,00	0,00	6,45	0,03	-2,21
DCtubB=DCtubB_1	47,62	55,56	67,74	0,02	-2,38
CtubB=CtubB_1	46,34	52,78	66,13	0,01	-2,58
Ftub=Ftub_2	29,41	13,89	27,42	0,01	-2,71
FAFT=FAFT_3	18,18	5,56	17,74	0,00	-2,83
CtubIn=CtubIn_2	35,71	27,78	45,16	0,00	-3,17
NFP=NFP_3	28,57	16,67	33,87	0,00	-3,28
Ffru=Ffru_1	14,29	5,56	22,58	0,00	-3,68
FBFT=FBFT_2	29,63	22,22	43,55	0,00	-3,93
Ttub=Ttub_1	22,73	13,89	35,48	0,00	-4,11
CfloIn=CfloIn_1	0,00	0,00	19,35	0,00	-4,59
CfloBIn=CfloBIn_1	0,00	0,00	19,35	0,00	-4,59
Cstem=Cstem_1	18,18	11,11	35,48	0,00	-4,67
CfloB=CfloB_1	0,00	0,00	22,58	0,00	-5,10
Fflo=Fflo_1	14,29	11,11	45,16	0,00	-6,55