

# INFORMATIVO

Instituto de Investigaciones Agropecuarias

GOBIERNO DE CHILE  
MINISTERIO DE AGRICULTURA  
INIA REMEHUE

## HUELLA DIGITAL DE ADN DE LAS VARIEDADES DE PAPA: UNA HERRAMIENTA DE APOYO AL COMERCIO LEGAL DE SEMILLA

BORIS SAGREDO D.

Bioquímico Ph. D., INIA Remehue  
[bsagredo@inia.cl](mailto:bsagredo@inia.cl)

ALEJANDRO PEÑA Z.

Ingeniero Agrónomo, SAG  
[alejandro.pena@sag.gob.cl](mailto:alejandro.pena@sag.gob.cl)

ANNETTE FAHRENKROG H.

Bioquímico, INIA Remehue  
[afahrenkrog@inia.cl](mailto:afahrenkrog@inia.cl)

### Importancia de la variedad de papa

Una variedad de papa se distingue de otras variedades según sus características de productividad, adaptación y precocidad, forma del tubérculo, color de piel y pulpa, resistencia y/o susceptibilidad a enfermedades, contenido de materia seca, calidad para fritura, entre otras. La expresión de estas y otras cualidades de la papa, están determinadas por factores genéticos en interacción con el medio ambiente. Estas características, asociadas a otras variables como calidad de semilla y un manejo agronómico adecuado, definen en última instancia su uso y destino como variedad (Ej. mercado del consumo fresco o productos procesados). La utilización de una variedad inadecuada generará un producto de calidad no deseada y por lo tanto puede producir pérdidas significativas al productor, empresa y/o disconformidad en los consumidores.

Actualmente en Chile, existen 159 variedades de papa registradas en la Lista de Variedades Descritas Oficialmente por el Servicio Agrícola y Ganadero (SAG), y 30 de ellas se encuentran inscritas en el Registro de Variedades Protegidas con derecho de propiedad intelectual. La actual legislación reconoce el derecho que el obtentor tiene sobre su variedad, otorgándole la exclusividad para multiplicar y comercializar la semilla de la variedad protegida por un período de 15 años. Además, este derecho faculta al obtentor de la variedad protegida a otorgar una licencia o autorización para que otro la

multiplique o reproduzca. Para obtener la licencia ha de pagarse al dueño de la variedad el precio convenido, "Royalty", cuyo monto es regulado por el mercado. Un porcentaje de este royalty retorna directamente a los programas de mejoramiento genético, para que estos continúen su importante labor de desarrollar nuevas variedades de papa.

La violación de la propiedad intelectual desalienta la creación de nuevas variedades en el país y/o la entrada de nuevos materiales de alto valor agronómico o comercial desde el exterior, lo que va en desmedro de la productividad agrícola nacional. Por lo tanto, el garantizar la identidad de una variedad de papa comercializada como semilla y/o sus productos, se constituye en un requisito esencial tanto para la protección de los derechos de los creadores de nuevas variedades, como de las empresas semilleras, de los productores y de las industrias procesadoras. A la vez, esto también va en directo favor de los consumidores quienes se beneficiarán de productos de mejor calidad.

Para la identificación de variedades de papa, según la UPOV (Unión Internacional para la Protección de las Obtenciones Vegetales), se utilizan alrededor de 50 parámetros descriptores de tipo morfoagronómico, como por ejemplo la morfología de flores y hojas, forma de tubérculo, color de pulpa, profundidad de ojos, entre otros. En Chile, el Servicio Agrícola y Ganadero (SAG) es la institución encargada de realizar las pruebas y ensayos para verificar que las características botánicas

Permitida la reproducción total o parcial de esta publicación citando la fuente y el autor.

Comité Editor: Luis Opazo R., Periodista; Humberto Navarro, Ing. Agr. M.Sc.;

Nolberto Teuber K. Ing. Agr. Ph. D.

INIA Remehue. Casilla 24-0 Osorno, Chile. Fono (64) 450420 Fax (64) 237746

La mención o publicidad de productos no implica recomendación de INIA Remehue.

Año 2008

INFORMATIVO Nº 66

[www.inia.cl](http://www.inia.cl)

y morfológicas descritas por los obtentores correspondan a la variedad que se pretende registrar. Las evaluaciones deben realizarse a lo largo de todo el período de desarrollo del cultivo, incluyendo etapas de postcosecha. En general, este es un sistema confiable cuando es realizado por un profesional calificado.

## Pruebas ADN para identificación varietal

Recientemente, gracias a técnicas de biología molecular que permiten detectar polimorfismos (diferencias) de ADN entre individuos, han surgido nuevas herramientas de identificación de variedades de papa. Estas pruebas se conocen como ADN-fingerprint o huella digital de ADN. Los marcadores más populares para estas pruebas de ADN son los microsatélites o SSRs. Estos corresponden

a secuencias repetitivas de ADN, presentes en el genoma de la papa, en donde la variación en el número de estas repeticiones permite diferenciar a distintos individuos entre sí. Estas secuencias de ADN, de distintos tamaños, son observadas como bandas al ser separadas en matrices porosas de agarosa o poliacrilamida mediante electroforesis, representando una imagen similar a los códigos de barra de los productos en un supermercado (Figura 1). Los SSRs pueden ser sintetizados in vitro utilizando la reacción en cadena de la polimerasa-PCR. La alta variabilidad que presentan los SSRs ha permitido hasta el momento, elaborar huellas o perfiles de ADN únicas para cada una de las variedades de papa cultivadas en Chile. Su utilización ha permitido detectar en forma rápida y oportuna problemas de manejo de materiales en campo y variedades mal clasificadas (Figura 2).

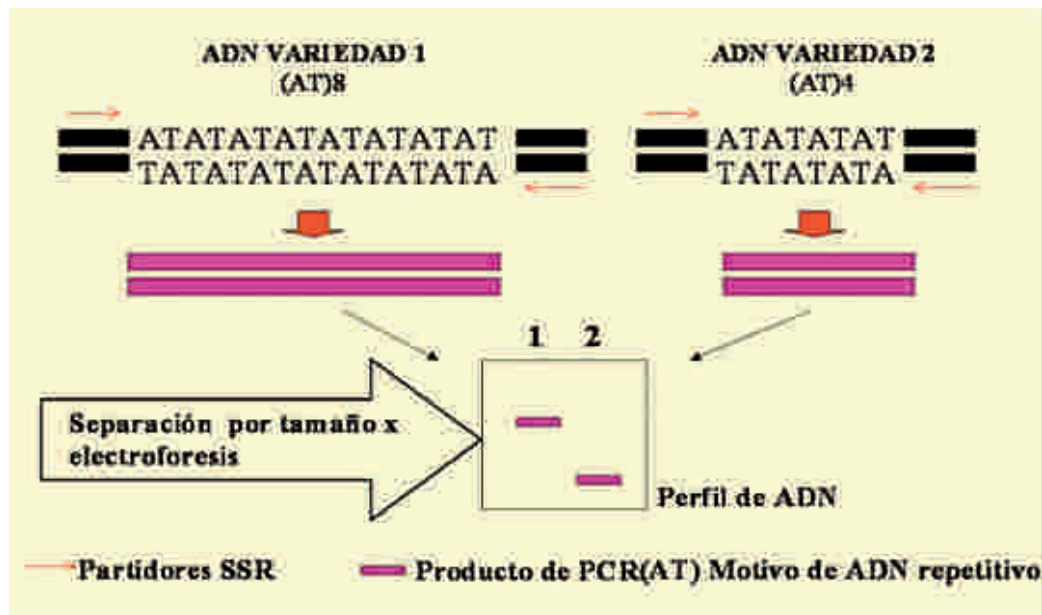


Figura 1. Representación esquemática de las secuencias de ADN SSRs para dos variedades diferentes y su síntesis a través de PCR, utilizando partidores específicos. Las diferencias en el tamaño de las secuencias permiten diferenciar a las dos variedades entre sí.

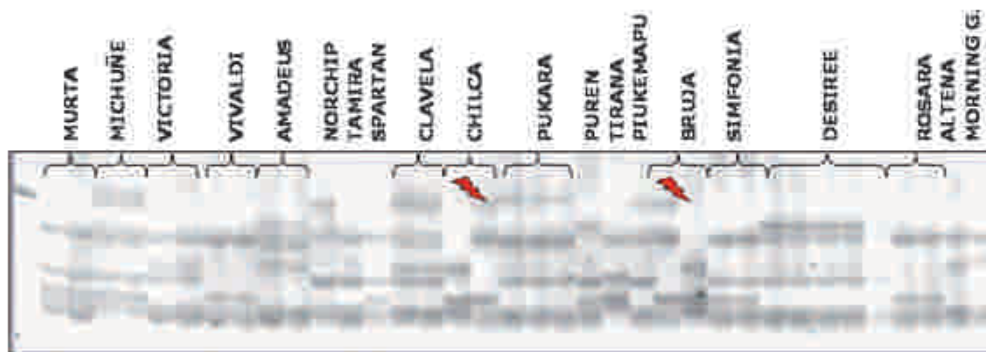


Figura 2. Perfiles de ADN elaborados para un grupo de variedades de papa utilizando el SSR STM1020. En rojo se muestra un caso de confusión de material de plantación en campo.

**Ventajas.** El uso de marcadores SSRs en identificación varietal permite:

- La identificación precisa de un individuo en cualquier estado de desarrollo.
- Se requieren cantidades ínfimas de tejido vegetal de cualquier tipo, incluyendo hoja, raíz, tallo, tubérculo o brote.
- Alta reproducibilidad de los resultados entre diferentes laboratorios.
- A diferencia de los caracteres morfológicos, los resultados no son afectados por el medio ambiente.
- Los resultados se obtienen en forma rápida, en menos de una semana (tres días).
- Los costos de análisis son moderados.

#### **Limitaciones.**

- En el caso de variedades obtenidas por mutaciones espontáneas (variantes clonales) o mediante transgenia (OGM), los SSR no son los más adecuados para la identificación y diferenciación de éstas con la variedad original. Para ello deben utilizarse otro tipo de marcadores moleculares.
- El uso de marcadores SSRs no es todavía una técnica oficialmente reconocida por la UPOV, aunque está en etapa de evaluación.

**Aplicaciones prácticas.** Las técnicas de ADN están especialmente recomendadas para solucionar problemas que requieran respuesta inmediata, tales como:

- Detección rápida y denuncia de fraudes durante la producción y comercialización de semilla de papa.
- Identificación rápida de plántulas in vitro.
- Determinación de identidad y mezcla varietal en cualquier estado de desarrollo del cultivo, incluso una vez cosechados los tubérculos.
- Verificación de identidad frente a un comportamiento inusual de la variedad.
- Detección y denuncia del uso ilegal de semillas de variedades protegidas.

## **Algunas consideraciones técnicas**

**¿Cómo colecto una muestra?** La muestra debe ser representativa para cada situación particular, evitando recolectar plantas de papa que crecen como malezas, plantas al borde de caminos y plantas marchitas o enfermas. Para evitar contaminaciones, la muestra debe ser recolectada directamente desde la planta a través de una bolsa. En el caso de hojas y brotes, la bolsa debe ser plástica. En el caso de tubérculos éstos deben ser almacenados en bolsas de papel, poniendo especial

cuidado de depositar los tubérculos limpios y secos, para evitar pudriciones.

La identificación de la muestra debe ser realizada al momento de ser recolectada para evitar confusiones. La etiqueta debe contener información básica como:

1. Nombre del recolector
2. Procedencia
3. Región
4. Tipo de tejido (hoja, brote, tubérculo)
5. Identificación de la muestra
6. Fecha de recolección

En el caso de muestras de hoja, éstas deben ser mantenidas en refrigerador a 4°C hasta su envío, para evitar la oxidación de los tejidos.

**Envío y recepción de muestras.** Las muestras provenientes del área libre de plagas cuarentenarias de la papa, pueden ser enviadas a INIA-Remehue (Región de Los Lagos). En el caso de muestras de tubérculos o partes de plantas de papa provenientes de otras zonas deberán ser enviadas a INIA-La Platina (RM).

**Almacenamiento.** Una vez recepcionada la muestra en el laboratorio, se procede a su preparación. Esto consiste en tomar una pequeña cantidad de tejido de aproximadamente 1 cm<sup>2</sup>, el cual es depositado en un tubo plástico estéril de 1,5 ml. Para asegurar la integridad del ADN las hojas frescas, la piel del tubérculo y/o brotes son conservados a 4°C por un plazo máximo de una semana. Para una mantención a largo plazo las muestras son congeladas a -20°C. En el caso de pulpa de tubérculo, debe ser congelada inmediatamente para evitar su oxidación.

**Análisis de laboratorio.** El análisis de laboratorio comienza con la extracción del ADN de cada muestra, para lo cual es necesario romper los tejidos y células a través de trituración mecánica y química con detergentes. Luego el ADN es separado de los otros componentes celulares utilizando solventes orgánicos. Para el análisis, se requiere extraer una cantidad aproximada de 20 ng de ADN. Una vez extraído, se realiza la síntesis artificial de las secuencias de ADN de interés para lo cual se utiliza la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). La PCR utiliza la enzima Taq polimerasa y ciclos térmicos para sintetizar millones de secuencias idénticas a partir del ADN molde, la zona de inicio de síntesis es marcada por un partidador específico para cada SSR. Luego, los fragmentos son separados por electroforesis en matrices



Figura 3. Representación esquemática del sistema de identificación varietal utilizando SSRs.

porosas de agarosa o poliacrilamida. Finalmente, las bandas o secuencias de ADN son visualizadas a través de tinción con nitrato de plata y analizadas según su tamaño. Los perfiles de ADN obtenidos, son comparados con los perfiles pre-establecidos en el laboratorio (Figura 3).

**Eficiencia de análisis.** Hasta el momento han sido estandarizadas las condiciones de laboratorio para 22 marcadores SSRs, los cuales al ser utilizados individualmente han podido diferenciar hasta un 53% de un amplio grupo de variedades de diverso origen. Sin embargo, la utilización de combinaciones de 3 SSRs permite aumentar enormemente la eficiencia de análisis hasta llegar a un 100%. Desde el punto de vista del tiempo de análisis, es posible obtener un resultado certero en dos días. La extracción de ADN y PCR se realiza durante el primer día, mientras que la electroforesis y análisis de datos, el segundo día. Esto ha sido posible debido al desarrollo de reacciones de PCR en condición de múltiplex, que consiste en realizar PCR simultáneamente con más de un SSRs, además de la utilización de protocolos rápidos de extracción de ADN.

**Entrega de resultados.** Los resultados del análisis pueden ser enviados de forma inmediata vía correo electrónico o por correo certificado, siendo este costo asumido por el demandante del análisis. La información obtenida es de carácter confidencial.

## Acceso a la tecnología y contacto

La tecnología de identificación utilizando perfiles de ADN está al alcance de cualquier persona o empresa que lo requiera, sin embargo oficialmente el INIA aún no presta el servicio a nivel comercial. Por esta razón, el costo de este tipo de análisis dependerá de cada situación particular. Más información puede ser solicitada a:

Dr. Boris Sagredo Díaz  
 Email: bsagredo@inia.cl  
 Fono/Fax: (64)450420/(64)237746  
 Km 8 Ruta 5 Sur, INIA-Remehue, Osorno.

## Glosario

**ADN.** Macromolécula responsable de la herencia genética de cualquier organismo vivo.

**Partidores.** Secuencias cortas de ADN que son complementarias a las zonas que bordean las secuencias SSRs, permiten dar inicio a la síntesis de nuevas hebras de ADN.

**Marcador.** Secuencia de ADN cuya presencia puede ser asociada a algún carácter determinado, como por ejemplo la resistencia a enfermedades, color o identidad varietal.