

## Diversidad genética entre variedades de papa (*Solanum tuberosum* L.) cultivadas en México usando marcadores RAPD e ISSR\*

### Genetic diversity among potato varieties (*Solanum tuberosum* L.) grown in Mexico, using RAPD and ISSR markers

Rose Onamu<sup>1</sup> y Juan Porfirio Legaria Solano<sup>1§</sup>

<sup>1</sup>Universidad Autónoma Chapingo-Departamento de Fitotecnia, Texcoco, Mexico. Carretera México-Texcoco, km 38.5, 56230. Chapingo, Estado de México. Tel: 01(595)952-1500. <sup>§</sup>Autor para correspondencia: legarias.juan@yahoo.com.

#### Resumen

Un análisis de datos consenso de RAPD e ISSR se utilizó para estudiar la diversidad genética en quince cultivares de papa (9 cultivares mejorados de Europa, N. América y México, y 6 cultivares criollos mexicanos) sembrados en México. Las amplificaciones usando cinco iniciadores decámeros al azar y cinco iniciadores ISSR generaron 138 bandas de las que 116 (84.4%) fueron polimórficas. El coeficiente de similitud más alto (0.89) se detectó entre los cultivares Fianna y Armada. En contraste, el coeficiente de similitud más bajo (0.55) se obtuvo entre Tollocan y Cambray Rosa Morelos. El alto nivel de diferenciación genética entre cultivares ( $G_{ST}=0.71$ ) y bajos valores de flujo genético ( $N_m=0.19$ ) a través de todos los *loci* indicaron que el nivel de divergencia genética entre los 15 cultivares es alta. El análisis de varianza molecular (AMOVA) reveló una contribución significativa de las diferencias entre regiones, entre cultivares, entre y dentro de las poblaciones a la diversidad genética total de los cultivares de papa estudiados. Datos consenso usando marcadores RAPD e ISSR fueron muy útiles para el estudio de la diversidad genética y estructura de poblaciones en cultivares de papa.

**Palabras clave:** AMOVA, estructura de poblaciones, variabilidad genética.

#### Abstract

A consensus analysis of RAPD and ISSR was used to study genetic diversity in fifteen potato cultivars (9 cultivars bred in Europe, N. America and Mexico, and 6 Mexican creole cultivars) grown in Mexico. Amplifications using five decamer primers randomly generated and five ISSR primers produced 138 bands, from which 116 (84.4%) were polymorphic. Cultivars Fianna and Armada showed the highest similarity coefficient (0.89). In contrast, Cambray Rose Tollocan and Morelos had the lowest similarity coefficient (0.55). High genetic differentiation among cultivars ( $G_{ST}=0.71$ ) and low gene flow ( $N_m=0.19$ ) across all *loci*, indicated high genetic divergence among the 15 cultivars. Analysis of molecular variance (AMOVA) revealed a significant contribution of differences among regions, among cultivars, among and within populations to the overall diversity of potato cultivars studied. Consensus data on RAPD and ISSR markers were very useful to study genetic diversity and population structure in potato cultivars.

**Keywords:** AMOVA, population structure, genetic variability.

\* Recibido: julio de 2013  
Aceptado: febrero de 2014

## Introducción

La papa (*Solanum tuberosum* L.) es uno de los cultivos más importantes a nivel mundial (Gopal y Khurana, 2006). Ocupa el cuarto lugar en producción para consumo humano, superado solamente por el trigo, arroz y maíz (Ross, 1986). Clasificaciones recientes reconocen alrededor de 100 especies silvestres y cuatro cultivadas (incluyendo a *Solanum tuberosum*) (Ovchinnikova *et al.*, 2011). En México, la papa se cultiva anualmente en una superficie de 69 054 ha, con una producción de 1 433 239 millones de toneladas y un rendimiento promedio de 26 t ha (SAGARPA, 2011). La papa se cultiva principalmente en los estados de Sinaloa, Sonora, Chihuahua, Coahuila, Guanajuato, Nuevo León, Jalisco, Michoacán, Veracruz y México (SAGARPA, 2011).

Si bien México no es centro de origen de las papas, se le considera un centro de diversidad secundario. Las variedades de papa cultivadas en México se diferencian en tres grupos: genotipos provenientes de Europa, de EE UU, y aquellos mejorados por organismos nacionales como el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) (Ferroni, 1981). El primer grupo representa el 50% de las variedades cultivadas (Alpha), el segundo 38% y el último alrededor de 8%. Los centros principales de diversidad y producción de papas nativas en México son las zonas aledañas al Nevado de Toluca y al Pico de Orizaba (Ugent, 1968).

Los cultivares europeos han sido fuertemente seleccionados para características deseables de modo que son menos diversos comparados con el 'pool' genético de Norteamérica y probablemente con el de México, especialmente las variedades criollas. En México existen fuertes diferencias entre los tipos de papas que cultivan diferentes agricultores. En el norte del país existen grandes unidades de producción donde predominan estándares tecnológicos avanzados, mientras que en el centro y sur predominan pequeñas unidades con pocos recursos.

Sólo 23% de la tierra dedicada al cultivo de la papa se cultiva con semilla certificada, que se compra por productores a gran escala. Los pequeños productores casi no utilizan semilla certificada o material sano. La mayoría de los productores pequeños utilizan semilla de la cosecha anterior o compran tubérculos destinados al mercado en fresco por los productores grandes. Los productores pequeños o intermedios siembran cultivares nativos coloridos que no tienen un sistema de distribución formal (Qaim, 1998). Las

## Introduction

Potato (*Solanum tuberosum* L.) is one of the most important crops worldwide (Gopal and Khurana, 2006). Potato ranks fourth in production for human consumption, surpassed only by wheat, rice and maize (Ross, 1986). Recent classifications recognize about 100 wild species and four cultivated (including *Solanum tuberosum*) (Ovchinnikova *et al.*, 2011). In Mexico, potatoes are grown annually in an area of 69 054 ha, with a production of 1 433 239 million tons and an average yield of 26 t ha<sup>-1</sup> (SAGARPA, 2011). The potato is mostly grown in Sinaloa, Sonora, Chihuahua, Coahuila, Guanajuato, Nuevo Leon, Jalisco, Michoacán, Veracruz and Mexico States (SAGARPA, 2011).

Although Mexico is not the center of origin of potatoes, it is considered a secondary center of diversity. Potato varieties grown in Mexico are differentiated into three groups: genotypes from Europe, U.S., and those bred by national agencies such as the National Institute of Forestry, Agriculture and Livestock (INIFAP) (Ferroni, 1981). The first group represents 50% of the cultivated varieties (Alfa), the second 38% and the last around 8%. The main centers of diversity and native potato production in Mexico are areas near the Nevado de Toluca and Pico de Orizaba (Ugent, 1968).

European cultivars have been strongly bred for desirable characteristics so they are less diverse compared to the North American and probably Mexican genetic pools, especially *versus* landraces. In Mexico there are strong differences among potato types grown by different farmers. In northern Mexico there are production units where advanced technological standards prevail, while in central and southern parts predominate small units with limited resources.

Only 23% of the land devoted to growing potatoes is grown from certified seed producers that purchase at large scale. Small farmers hardly use healthy certified seed or material. Most small farmers use seeds from the previous harvest or buy tubers in the fresh market from large producers. Small or intermediate producers plant colorful native cultivars lacking a formal distribution system (Qaim, 1998). Cultivated potatoes are propagated as clones for purity however genetic diversity is maintained through wide crosses and developing new cultivars.

There is high potato diversity in Mexico, but this rich genetic resource is not used as it should due to the scarce genetic information (Becerra and Paredes, 2000) and sexual

papas cultivadas se propagan como clones para mantener su pureza, sin embargo, la diversidad genética se mantiene a través de cruces amplias y desarrollando nuevos cultivares. En México existe gran diversidad de papas; sin embargo, este rico recurso genético no se utiliza como debiera debido a la escasa información genética existente (Becerra y Paredes, 2000) y al aislamiento sexual resultante de incompatibilidad entre especies 1EBN en México y especies 2EBN y 4 EBN de Suramérica (Jansky y Hamernik, 2009). El conocimiento de la diversidad genética del germoplasma y los patrones de estructura poblacional entre materiales a mejorar y cultivares es importante para el desarrollo de estrategias de conservación adecuadas, para el mejoramiento genético y para la utilización de las plantas cultivadas. Información previa acerca de la diversidad genética ha sido obtenida usando marcadores morfológicos (Hijmans y Spooner, 2001) e isoenzimas (Douches y Ludlam, 1991).

Éstas técnicas aunque han sido útiles, presentan algunas limitantes como el ser altamente influenciadas por las condiciones ambientales y el bajo número de marcadores que presentan (Semagn, 2006). El desarrollo de marcadores más simples, más económicos y más fáciles de obtener, basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), han mejorado en gran medida la información genética disponible (Powell *et al.*, 1995). Tales marcadores incluyen a los RAPD e ISSR, que se han utilizado extensivamente para caracterizar genotipos de papa (Milbourne *et al.*, 1997; Prevost *et al.*, 1999; McGregor *et al.*, 2000; Bornet *et al.*, 2002; Orona-Castro *et al.*, 2006; Yasmin *et al.*, 2006).

Los RAPD (polimorfismos en el ADN amplificados al azar) e ISSR (inter-secuencias simples repetidas) han llegado a ser muy populares en estudios de poblaciones de plantas (Bartish *et al.*, 1999; Bussell, 1999; Nybom y Bartish, 2000). En el presente estudio se caracterizó la diversidad genética entre cultivares de papa usando datos consenso de marcadores RAPD e ISSR.

## Material y métodos

### Material vegetal

Quince cultivares de papa se obtuvieron en varios estados de la República Mexicana de fuentes de semilla certificada, del Banco de Germoplasma del Departamento de Fitotecnia de la Universidad Autónoma Chapingo (UACH), y de

isolation resulting from incompatibility among 1EBN species in Mexico and 2EBN and 4EBN species from South America (Jansky and Hamernik, 2009). Knowledge of germplasm genetic diversity and patterns of population structure patterns among breeding materials and cultivars is important for developing appropriate conservation strategies for breeding and utilization of cultivated plants. Prior information about genetic diversity has been obtained using morphological markers (Hijmans and Spooner, 2001) and isozymes (Douches and Ludlam, 1991).

These techniques have been useful, although they have some limitations, such as high influence by environmental conditions and low number of markers present (Semagn, 2006). Development of simpler, cheaper and easier to obtain markers, based on the polymerase chain reaction (PCR) have greatly improved genetic information (Powell *et al.*, 1995). Such markers include RAPD and ISSR, which have been used extensively to characterize potato genotypes (Milbourne *et al.*, 1997; Prevost *et al.*, 1999; McGregor *et al.*, 2000; Bornet *et al.*, 2002; Orona-Castro *et al.*, 2006; Yasmin *et al.*, 2006).

RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) and ISSR (inter-simple sequence repeats) have become very popular in studies of plant populations (Bartish *et al.*, 1999; Bussell, 1999; Nybom and Bartish, 2000). In the present study, genetic diversity among potato cultivars was characterized, using consensus data from RAPD and ISSR markers.

## Materials and methods

### Plant material

Fifteen potato cultivars were obtained in several states of Mexico from certified seed sources, the Department of Plant Sciences Germplasm Bank at Chapingo Autonomous University (UACH) and local producers (Table 1). Sections from five randomly selected tubers per cultivar, were obtained, a total of 75 individuals for analysis. Samples included nine bred cultivars and six landraces.

### Purification of DNA

DNA was purified according to the protocol of Dellaporta *et al.* (1983) with some modifications. Sections of tubers weighing 0.3 g were macerated in liquid nitrogen to a fine powder. The sample was placed in a 1.5 mL microtube

productores locales (Cuadro 1). Se obtuvieron secciones de cinco tubérculos seleccionados al azar por cultivar para tener un total de 75 individuos para su análisis. Las muestras incluyeron nueve cultivares mejorados y seis variedades criollas.

(Eppendorf) containing 600 uL of extraction buffer (20 mL 1 M Tris- HCL, pH 8, 20 mL 0.5 M EDTA , pH 8, 20 mL 5 M NaCl, 35 uL  $\beta$ -mercaptoethanol, 40 ml 20% sodium dodecyl sulfate) and was incubated at 65 °C for 10 min with occasional tube inversion.

**Cuadro 1. Lista de cultivares, su origen y tipo, utilizados en el presente estudio.**

**Table 1. List of cultivars, origin and type used in the present study.**

Abreviación	Detalles	Origen	Tipo
CRM	Cambray rosa Morelos	México	Varietad criolla
CE	Criolla Edo. Mex.	México	Varietad criolla
AGE	Alfa grande	Europa	Cultivar mejorado
ATL	Atlantic	EE UU	Cultivar mejorado
ARM	Armada	Europa	Cultivar mejorado
FIA	Fianna	Europa	Cultivar mejorado
MOTE	Montserrat	México	Cultivar mejorado
MDL	Mondial	Europa	Cultivar mejorado
GIG	Gigant	Europa	Cultivar mejorado
CBLANC	Cambray blanca Edo. Mex.	México	Varietad criolla
TOLL	Tollocan	México	Cultivar mejorado
MOCH	Mochis	México	Cultivar mejorado
CAMBRD	Cambrayrosa DF	México	Varietad criolla
CRIOBP	Criolla blanca Puebla	México	Varietad criolla
PAPACHIC	Papa chica	México	Varietad criolla

**Purificación del DNA**

La purificación del DNA se hizo de acuerdo al protocolo de Dellaporta *et al.* (1983) con algunas modificaciones. Secciones de tubérculos pesando 0.3 g se maceraron en nitrógeno líquido hasta obtener un polvo muy fino. La muestra se colocó en un microtubo (Eppendorf) de 1.5 mL que contenía 600  $\mu$ L de amortiguador de extracción (20 mL Tris-HCL 1 M, pH 8.0; 20 mL EDTA 0.5 M, pH 8.0; 20 mL NaCl 5 M; 35  $\mu$ L  $\beta$ -mercaptoetanol; 40 mL dodecil sulfato de sodio 20%) y se incubó a 65 °C por 10 min, con inversión ocasional de los tubos.

Después, se adicionó 200  $\mu$ L de acetato de potasio 5M, se mezcló por inversión y se incubó en hielo por 30 min. Se centrifugó a 8 000 x g durante 10 min a temperatura ambiente, y el sobrenadante se transfirió a otro tubo que contenía 700  $\mu$ L de isopropanol frío (-20 °C). Se mezcló por inversión e incubó a -20 °C por 30 min y centrifugó por 5 min a 8 000 x g a temperatura ambiente. El sobrenadante se eliminó, se recobró el precipitado y se disolvió en 200  $\mu$ L de solución para diluir (Tris-HCl 50 mM, EDTA- $\text{Na}_2$  10 mM, pH 8.0). Para eliminar el RNA se añadió 2  $\mu$ L de RNAasa A y se incubó a 37 °C por 1 h.

Then 200 uL of 5M potassium acetate were added, mixed by inversion and incubated on ice for 30 min. The mixture was centrifuged at 8 000  $\times$  g for 10 min at room temperature, and the supernatant was transferred to another tube containing 700 uL of cold isopropanol (-20 °C). It was mixed by inversion, incubated at -20 °C for 30 min and centrifuged for 5 min at 8 000  $\times$  g at room temperature. The supernatant was removed the precipitate was recovered and dissolved in 200 uL of diluting solution (50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA- $\text{Na}_2$ , pH 8). RNA was removed by adding 2 mL RNAse A and incubating at 37 °C for 1h.

Then 20 ul of 3M sodium acetate plus 200 uL of isopropanol were added, mixed by inversion and allowed to precipitate at -20 °C for 2 h. It was centrifuged at 8 000  $\times$  g, for 5 min at room temperature. The supernatant was removed and the precipitate was washed with 300 uL of 70% ethanol. The pellet was dried and dissolved in TE buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA- $\text{Na}_2$ , pH 8.0) at 4 °C. DNA concentration was quantified using a Genesys® 10 UV Scanning spectrophotometer (Thermo Scientific) and DNA quality was verified by electrophoresis on a 0.8% (w/v) agarose gel. The DNA was used in subsequent PCR reactions.

Después se adicionó 20  $\mu\text{L}$  de acetato de sodio 3M más 200  $\mu\text{L}$  de isopropanol, se mezcló por inversión y se dejó precipitar a  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  por 2 h. Se centrifugó a  $8000 \times g_n$  por 5 min a temperatura ambiente. El sobrenadante se eliminó y el precipitado se lavó con 300  $\mu\text{L}$  de etanol al 70%. La pastilla se secó y se disolvió en amortiguador TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA- $\text{Na}_2$  1 mM, pH 8.0) a  $4\text{ }^\circ\text{C}$ . La concentración del ADN se cuantificó usando un espectrofotómetro Genesys 10 uv Scanning® (Thermo Scientific) y se verificó la calidad mediante electroforesis en un gel de agarosa al 0.8% (w/v). El DNA se utilizó en posteriores reacciones de PCR.

### Condiciones de reacción para RAPD

Cinco iniciadores RAPD de las series A y D Operon® (Operon Technologies Inc, Alameda, CA, USA) se seleccionaron de un total de 25 (Cuadro 2). Las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador Techne® TC-512. La mezcla de reacción se realizó en un volumen de 25  $\mu\text{L}$ , que incluyó 4.2  $\mu\text{L}$  de agua doble destilada estéril, 10  $\mu\text{L}$  de dNTPs (500  $\mu\text{M}$ ), 2.5  $\mu\text{L}$  de amortiguador 10X (Tris-HCl 750 mM, pH 8.8;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  200 mM; Tween 20 a 1% (v/v)); 1.0  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  (50 mM); 3.0  $\mu\text{L}$  de iniciador a una concentración de 10 pM; 0.3  $\mu\text{L}$  de enzima Taq DNA polimerasa a una concentración de 5U  $\mu\text{L}^{-1}$ ; y 4  $\mu\text{L}$  de DNA genómico a una concentración de 10 ng  $\mu\text{L}^{-1}$ .

### RAPD reaction conditions

Five RAPD primers of Operon® A and D Series (Operon Technologies Inc., Alameda, CA, USA) were selected from a total of 25 (Table 2). PCR reactions were performed in a Techne thermal cycler TC-512®. The reaction mixture was prepared as a 25  $\mu\text{L}$  volume, including 4.2  $\mu\text{L}$  sterile double distilled water, 10  $\mu\text{L}$  dNTPs (500  $\mu\text{M}$ ), 2.5  $\mu\text{L}$  10 $\times$  buffer (750 mM Tris-HCl, pH 8.8, 200 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 1% (v/v) Tween 20, 1  $\mu\text{L}$   $\text{MgCl}_2$  (50 mM), 3  $\mu\text{L}$  primer at 10 pM, 0.3  $\mu\text{L}$  Taq DNA polymerase at 5U  $\mu\text{L}^{-1}$ , and 4  $\mu\text{L}$  genomic DNA at 10 ng  $\mu\text{L}^{-1}$ .

The reaction conditions were: one cycle at  $94\text{ }^\circ\text{C}$ , 2 min, 38 cycles [ $94\text{ }^\circ\text{C}$  for 30s,  $40\text{ }^\circ\text{C}$  for 30s,  $72\text{ }^\circ\text{C}$  for 90s], with an extension of  $72\text{ }^\circ\text{C}$  for 2 min. The amplified fragments were separated by electrophoresis on 1.2% (w/v) agarose gel in TAE buffer (40 mM Tris- acetate, pH 7.6, 1 mM EDTA  $\text{Na}_2$ ) for 1 h at 120 V. Gels were stained in ethidium bromide (0.5 mg  $\text{mL}^{-1}$ ) for 15 min, the excess dye was removed by rinsing in distilled water for 5 min and the gel was documented under UV light. The amplification reactions were repeated at least twice.

### ISSR Reaction conditions

For ISSR reactions, 5 primers were used, out of 10 tested (Table 2). The amplification reactions were performed with similar volume and reagents to RAPD except for reaction

**Cuadro 2. Lista de iniciadores RAPD e ISSR, secuencias 5'-3', productos amplificados y polimorfismo detectado.**

**Table 2. List of RAPD and ISSR primers, sequences 5'-3', amplified products and detected polymorphism.**

Iniciador	Secuencia (5'-3')	Prod. amp.	Polimorfismo (%)
<b>RAPD</b>			
A02	TGC CGA GCT G	9	77.70
A05	AGG GGT CTT G	13	92.30
D10	GGT CTA CAC C	11	90.90
D11	AGC GCC ATT G	18	94.40
D02	GGA CCC AAC C	16	87.50
<b>ISSR</b>			
	Secuencia (5'-3')	Prod. amp. 14	Polimorfismo (%)
P1	GAG CAA CAA CAA CAA CAA	14	57.10
P2	CTG AGA GAG AGA GAG AGA	15	80.00
P3	AGA GAG AGA GAG AGA GTG	14	92.80
P4	ATG ATG ATG ATG ATG	14	78.60
P5	AGA GAG AGA GAG AGA G	14	92.80
Promedio	13.80		84.41

Las condiciones de reacción fueron: un ciclo a  $94\text{ }^\circ\text{C}$ , 2 min; 38 ciclos [ $94\text{ }^\circ\text{C}$  por 30 s,  $40\text{ }^\circ\text{C}$ , por 30 s,  $72\text{ }^\circ\text{C}$  por 90 s]; con una extensión de  $72\text{ }^\circ\text{C}$  por 2 min. Los fragmentos amplificados se separaron por electroforesis en un gel de agarosa a 1.2% (p/v) con amortiguador TAE (40 mM Tris-

conditions:  $94\text{ }^\circ\text{C}$  for 5 min, 35 cycles at  $94\text{ }^\circ\text{C}$  for 30 seg, annealing temperature for 45 seg,  $72\text{ }^\circ\text{C}$  for 2 min, and a final extension step at  $72\text{ }^\circ\text{C}$  for 10 min. The annealing temperature was in the range of 40 to  $58\text{ }^\circ\text{C}$  and cycles were reduced to 30. The amplified fragments were separated by

acetato, pH 7.6; 1 mM Na<sub>2</sub> EDTA), por 1 h a 120 V. Los geles se tiñeron en bromuro de etidio (0.5 mg mL<sup>-1</sup>) por 15 min; el exceso de colorante se eliminó lavando el gel con agua destilada por 5 min y se documentó bajo luz UV. Las reacciones de amplificación se repitieron al menos dos veces.

### Condiciones de reacción para ISSR

Para las reacciones ISSR, se usaron 5 iniciadores de un total de 10 probados (Cuadro 2). Las reacciones de amplificación se realizaron en un volumen y con reactivos semejantes a los RAPD excepto para las condiciones de reacción: 94 °C por 5 min, 35 ciclos a 94 °C por 30 s, temperatura específica de alineamiento por 45 s y 72 °C por 2 min y un ciclo de extensión final a 72 °C por 10 min. La temperatura de alineamiento estuvo en un rango de 40 a 58 °C y los ciclos se redujeron a 30. Los fragmentos amplificados se separaron por electroforesis en geles de agarosa al 1.5 % (p/v) con amortiguador TAE (40 mM Tris-acetato, pH 7.6; 1 mM Na<sub>2</sub> EDTA), por 1 h a 120 V. Los geles se tiñeron con bromuro de etidio (0.5 mg mL<sup>-1</sup>) por 15 min y el exceso de colorante se eliminó enjuagando en agua destilada por 15 min y documentados bajo luz UV. Las reacciones de amplificación se repitieron al menos dos veces.

### Análisis de los datos

Todos los geles fueron evaluados para visualizar y registrar el número de bandas mono y polimórficas. La evaluación se llevó a cabo en forma cuidadosa e independiente por dos miembros del laboratorio. Bandas difusas o dudosas no fueron consideradas para el análisis. Se asumió que bandas del mismo peso molecular en diferentes individuos son idénticas. La presencia de una banda se indicó con un uno (1) y la ausencia con un cero (0).

El análisis de los datos se realizó utilizando los paquetes estadísticos NTSYS-pc versión 2.1 (Rohlf, 2000) y POPGEN32 (Yeh *et al.*, 1999). Para estimar parámetros de polimorfismo a nivel de poblaciones la matriz de datos de presencia/ausencia se analizó con el programa POPGEN32. Los parámetros genéticos evaluados al nivel de poblaciones fueron el porcentaje de *loci* polimórficos entre cultivares (P), el coeficiente de diferenciación genética entre poblaciones ( $G_{ST}$ ), el número de individuos migrantes (Nm) y el índice de identidad genética de Nei (1973).

Para describir la estructura genética y la variabilidad entre las poblaciones se realizó un análisis de varianza molecular no-paramétrica (AMOVA), por sus siglas en inglés, utilizando

electrophoresis on 1.5% (w/v) agarose gels in TAE buffer (40 mM Tris- acetate, pH 7.6, 1 mM Na<sub>2</sub> EDTA) for 1 h at 120 V. Gels were stained in ethidium bromide (0.5 mg mL<sup>-1</sup>) for 15 min, excess dye was removed by rinsing in distilled water for 15 min and gels were documented under UV light. The amplification reactions were repeated at least twice.

### Data analysis

Gels were visually inspected to score the number of mono- and polymorphic bands. Gel were analyzed carefully and independently by two laboratory members. Diffuse or faint bands were not considered for analysis. Bands of similar molecular weight were assumed as identical in different individuals. The presence of a band is indicated with one (1) and absence with zero (0).

Data analysis was performed using the statistical package NTSYS-pc version 2.1 (Rohlf, 2000) and POPGEN32 (Yeh *et al.*, 1999). The presence/absence data matrix was analyzed with POPGEN32 to estimate parameters of polymorphism at the population level. Genetic parameters evaluated at the population level were the percentage of polymorphic *loci* among cultivars (P), the coefficient of genetic differentiation among populations ( $G_{ST}$ ), the number of migrant individuals (Nm) and Nei's index of genetic identity (1973).

Analysis of non-parametric molecular variance (AMOVA) was performed to describe the genetic structure and variability among populations, using GenAlEx 6.2 (Peakall and Smouse, 2006) with 999 permutations, where variance components were divided among individuals within populations, among populations within regions and among regions or groups.

## Results and discussion

### Primer patterns

Ten primers (5 RAPD and 5 ISSR) were used to amplify DNA of five individuals from each of the 15 potatoes varieties grown in Mexico (Tables 1 and 2). A total of 138 *loci* were studied. The average number of bands per primer was 13.8, ranging from 9 to 18 (Table 2). RAPD and ISSR analysis of varieties allowed the estimation of genetic similarity and differences among the genotypes studied.

el programa GenAEx 6.2 (Peakall y Smouse, 2006) con 999 permutaciones, donde los componentes de varianza se dividieron entre individuos, dentro de poblaciones, entre poblaciones dentro de regiones y entre regiones o grupos.

## Resultados y discusión

### Patrones de iniciadores

Diez iniciadores (5 RAPD y 5 ISSR) se utilizaron para amplificar el DNA de 5 individuos de cada una de las 15 variedades de papa cultivadas en México (Cuadros 1 y 2). Se estudiaron 138 *loci*. El número promedio de bandas revelado por un iniciador dado fue de 13.8, oscilando entre 9 y 18 (Cuadro 2). El análisis de las variedades basado en RAPD e ISSR permitió estimar la similitud genética y las diferencias existentes entre los genotipos estudiados.

### Análisis de agrupamientos

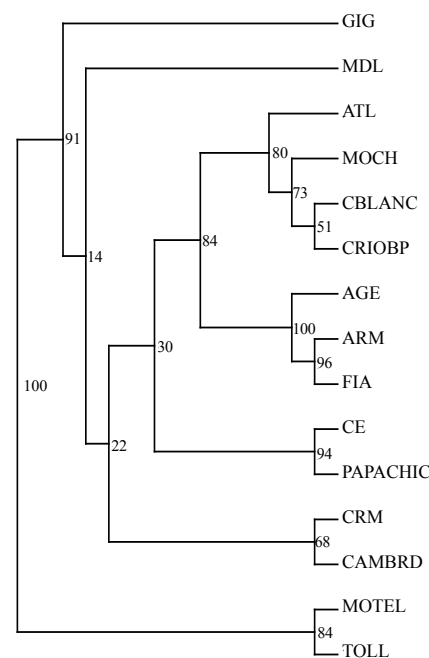
El análisis de grupos usando el coeficiente de similitud de Jaccard (Jaccard, 1908) separó a los cultivares en siete grupos diferentes (Figura 1). El primer grupo lo formaron Tollocan y Montserrat y fue el más divergente del resto de los cultivares. Ambas variedades han sido obtenidas por el INIFAP (Toluca y Saltillo, respectivamente) y ésta puede ser una razón del porqué la alta similitud existente entre ellas y la divergencia con las demás. Gigant formó el segundo grupo, Cambray Rosa Morelos y Cambray Rosa DF el tercero, Mondial constituyó el cuarto grupo, mientras que Criolla Edo Mex y Papa Chica formaron el quinto.

El sexto grupo lo integraron tres cultivares europeos (Alfa Grande, Armada y Fianna), mientras que el séptimo grupo se formó con el cultivar mexicano mejorado Mochis, variedades criollas con tubérculos de piel blanca (Cambray Blanca Edo. Mex. y Criolla Blanca Puebla) y Atlantic de Norteamérica. Éste último grupo relaciona las papas mexicanas y la americana, lo que parece asociarse mejor con los resultados señalados más adelante respecto a la diversidad entre grupos (Americano, Europeo y Mexicano). Además la variedad Atlantic parece formar un grupo intermedio entre un grupo de papas mexicanas y un grupo de papas europeas.

El uso de datos consenso de RAPD e ISSR diferenció con éxito a los cultivares de papa sembrados en México. Sin embargo, el análisis no agrupó completamente a los materiales

### Cluster analysis

Cluster analysis using Jaccard's similarity coefficient (Jaccard, 1908) separated the cultivars into seven different groups (Figure 1). The first group consisted of Tollocan and Montserrat and was the most divergent from the other cultivars. Both varieties were obtained by INIFAP (Toluca and Saltillo, respectively) and this may account for the high similarity between them and divergence with the other. The second group comprised only Gigant, the third included Cambray Rosa Morelos and Cambray Rosa DF, Mondial formed the fourth group, while Criolla Edo. Mex. and Papa Chica formed the fifth.



**Figura 1. Dendrograma de similitudes entre 15 cultivares de papa, obtenido utilizando coeficientes de similitud de Jaccard's (1908).** Los números en las ramas indican el número de veces en que la topología de una rama en particular se repite después de 1 000 remuestreos (bootstrapping). Detalles acerca de los cultivares se indican en el Cuadro 1.

**Figure 1. Similarity dendrogram among 15 potato cultivars obtained using Jaccard's similarity coefficients (1908).** Numbers on the branches indicate the number of times a particular branch topology is repeated after 1 000 resampling (bootstrapping). Details about cultivars are listed in Table 1.

The sixth group included three European cultivars (Alfa Grande, Armada y Fianna), while the seventh group comprised the Mexican Mochis bred cultivar, white skinned tuber landraces (Cambray Blanca Edo. Mex. and Criolla

en base a su origen geográfico. Algunos caracteres como el color de piel de los tubérculos fueron claramente agrupados en grupos separados. Esto se demuestra al observar que las variedades criollas con piel de tubérculo color rojo como Cambray Rosa Morelos, Cambray Rosa DF, Criolla Edo. Mex. y Papa Chica pertenecen a grupos separados de los cultivares y variedades criollas que tienen tubérculos con color de piel blanca. El coeficiente de similitud de Jaccard osciló entre 0.55 (para Cambray Rosa Morelos y Tollocan) y 0.89 (para Armada y Fianna) (Cuadro 3), lo que sugiere que los materiales evaluados están genéticamente medianamente relacionados dado que la diferencia entre uno y otro valor de similitud es de aproximadamente 0.34.

Blanca Puebla) and Atlantic of North America. This last group relates Mexican and American potatoes, which is more consistent with the results below, regarding diversity among groups (American, European and Mexican). In addition, the Atlantic variety seems to be an intermediate cluster between a Mexican potatoes cluster and a European potatoes cluster.

Consensus RAPD and ISSR data successfully distinguished potato cultivars grown in Mexico. However, analysis showed only partial clustering of materials based on their geographical origin. Some traits like tuber skin color were clearly clustered into separate groups. This is supported by

**Cuadro 3. Valores de similitud genética entre cultivares de papa según el coeficiente de Jaccard's (1908) con marcadores RAPD e ISSR.**

**Table 3. Genetic similarity among potato cultivars according to Jaccard's coefficient (1908) with RAPD and ISSR markers.**

Cultivares	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1	1														
2	0.67	1													
3	0.64	0.74	1												
4	0.65	0.74	0.77	1											
5	0.63	0.71	0.84	0.77	1										
6	0.62	0.68	0.83	0.74	0.89	1									
7	0.56	0.61	0.59	0.61	0.6	0.59	1								
8	0.58	0.63	0.64	0.68	0.68	0.66	0.59	1							
9	0.63	0.62	0.67	0.67	0.64	0.65	0.57	0.64	1						
10	0.63	0.71	0.74	0.78	0.75	0.74	0.57	0.66	0.68	1					
11	<b>0.55</b>	0.62	0.61	0.62	0.59	0.58	0.64	0.57	0.55	0.6	1				
12	0.65	0.68	0.68	0.77	0.7	0.71	0.61	0.67	0.64	0.82	0.61	1			
13	0.7	0.68	0.64	0.68	0.66	0.64	0.6	0.62	0.63	0.7	0.63	0.73	1		
14	0.65	0.68	0.71	0.79	0.71	0.71	0.6	0.66	0.67	0.83	0.58	0.8	0.68	1	
15	0.61	0.77	0.64	0.66	0.63	0.62	0.6	0.62	0.59	0.64	0.6	0.67	0.67	0.66	1

1= Cambray Rosa Morelos; 2= Criolla Edo. Mex.; 3= Alpha grande; 4= Atlantic; 5= Armada; 6= Fianna; 7= Montserrat; 8= Mondial; 9= Gigant; 10= Cambray Blanca Edo. Mex.; 11= Tollocan; 12= Mochis; 13= Cambray; Rosa DF; 14= Criolla blanca Puebla; 15= Papa chica.

Cambray Rosa Morelos es una variedad criolla, mientras que Tollocan es un cultivar mejorado por INIFAP, de ahí que sean genéticamente las más diferentes, mientras que Armada y Fianna son dos variedades europeas muy parecidas. Orona *et al.* (2006), demostraron la existencia de diversidad genética entre cultivares de papa sembrados en México utilizando marcadores RAPD y SSR. Estos investigadores obtuvieron coeficientes de similitud en un rango de 0.52 a 0.87 y 0.60 a 0.90 para RAPD y SSR, respectivamente. De igual manera, Rocha *et al.* (2010), reportaron diversidad genética presente entre cultivares de papa norteamericanos y europeos crecidos en Brasil

the fact that red skinned tuber landraces as Cambray Rosa Morelos, Cambray Rosa DF, Criolla Edo. Mex. and Papa Chica clustered apart from white skinned tuber cultivars and landraces. Jaccard's similarity coefficient ranged from 0.55 (for Cambray Rosa Morelos and Tollocan) and 0.89 (for Armada and Fianna) (Table 3), suggesting that evaluated materials are genetically moderately related as the difference between the two similarity values is approximately 0.34.

Cambray Rosa Morelos is a landrace, while Tollocan is a cultivar bred by INIFAP hence they are genetically more different, while Armada and Fianna are two very



con coeficientes de similitud en un intervalo de 0.50 a 0.73 y de 0.46 a 0.72, usando marcadores RAPD y SSR, respectivamente.

Si bien algunos cultivares europeos agruparon a los genotipos (Fianna, Armada y Alfa Grande), indicando alta similitud entre los mismos, no se puede ignorar la existencia de algún grado de diversidad genética en el 'pool' europeo debido a que el resto de los cultivares formó parte de otros grupos diferentes (Gigant y Mondial) (Figura 1). Estas variedades europeas son muy antiguas y algunas han sido empleadas en la formación de nuevas variedades. Hay una alta similitud entre ellas de 0.83 a 0.89 (Cuadro 3).

Entre las variedades criollas de México existe diversidad genética, esto quedó demostrado en virtud de que los cultivares con tubérculos con cubiertas blancas formaron grupos separados en relación a los cultivares con tubérculos con color de piel roja (Figura 1). Ispizua *et al.* (2007), reportaron alta (0.55) diversidad genética entre variedades criollas del noroeste de Argentina usando marcadores SSR. Tollocan y Montserrat, cultivares mejorados mexicanos fueron los más divergentes del resto de cultivares sembrados en México, con un valor de remuestreo igual a 100 (Figura 1). Entre Tollocan y Montserrat hay una similitud intermedia (0.64), lo que indica también cierto nivel de divergencia entre ellos. Estos dos cultivares podrían ser utilizados individualmente como progenitores adecuados en programas de mejoramiento para mejorar la diversidad genética.

El coeficiente de similitud más alto se obtuvo entre Fianna y Armada con un valor de 0.89 (Cuadro 3). Bernet *et al.* (2002) y Rousselle *et al.* (1996) reportaron alta similitud entre cultivares europeos debido a que han sido mejorados fuertemente y tienden a mostrar variabilidad genética baja. Lunga'ho *et al.* (2011) reportaron variabilidad genética baja entre accesiones de papa europeas comparadas con accesiones de Suramérica procedentes del Centro Internacional de la Papa (CIP) en Kenya.

En contraste, un coeficiente de similitud bajo se obtuvo entre Tollocan y Cambray Rosa Morelos con un valor de 0.55 (Cuadro 3). Tollocan es un cultivar mejorado mexicano mientras que Cambray Rosa Morelos es una variedad criolla, esto puede explicar la amplia variabilidad detectada. Estos resultados demuestran la existencia de amplia variabilidad genética dentro del 'pool' genético mexicano.

similar European varieties. Orona *et al.* (2006) demonstrated the existence of genetic diversity among potato cultivars grown in Mexico using RAPD and SSR markers. They obtained similarity coefficients in a range from 0.52 to 0.87 and 0.60 to 0.90 for RAPD and SSR, respectively. Similarly, Rocha *et al.* (2010) reported genetic diversity among American and European potato cultivars grown in Brazil, with similarity coefficients ranging from 0.50 to 0.73 and from 0.46 to 0.72, based on RAPD and SSR markers, respectively.

While some European cultivars clustered Fianna, Armada and Alfa Grande genotypes, indicating high similarity among them, there is some degree of genetic diversity in the European pool that cannot be overlooked since the remaining cultivars belonged to other groups (Gigant and Mondial) (Figure 1). These European varieties are very old and some have been used in breeding new varieties. There is a high similarity among them from 0.83 to 0.89 (Table 3).

Genetic diversity among Mexican landraces is shown by white skinned tuber cultivars clustering apart from red skinned ones (Figure 1). Ispizua *et al.* (2007) reported high (0.55) genetic diversity among landraces of northwestern Argentina using SSR markers. Tollocan and Montserrat, Mexican bred cultivars, were the most divergent from other cultivars grown in Mexico, with a resampling value of 100 (Figure 1). Tollocan and Montserrat show intermediate similarity (0.64), which also indicates certain divergence between them. These two cultivars could be used individually as suitable parents in breeding programs to improve genetic diversity.

The highest similarity coefficient was obtained between Fianna and Armada with a value of 0.89 (Table 3). Bernet *et al.* (2002) and Rousselle *et al.* (1996) reported high similarity among European cultivars since they are highly bred and tend to show low genetic variability. Lunga'ho *et al.* (2011) reported low genetic variability among European potato accessions compared to South American accessions from the International Potato Center (CIP) in Kenya.

In contrast, a low similarity coefficient was obtained between Tollocan and Cambray Rosa Morelos with a value of 0.55 (Table 3). Tollocan is a Mexican bred cultivar while Cambray Rosa Morelos is a landrace, this may explain

Tollocan y Montserrat se reportan con resistencia a tizón tardío. Debido a que Tollocan y Cambray Rosa Morelos son muy divergentes se podría utilizar a estas dos variedades como progenitores para iniciar un programa de mejoramiento genético en el que se introducirían algunas características interesantes del cultivar criollo al mejorado.

### Diversidad genética y diferenciación

El porcentaje de *loci* polimórficos (P) entre los cultivares fue de 86.23%. El coeficiente de diferenciación genética entre los cultivares fue alto ( $G_{ST}= 0.71$ ), e indica que aproximadamente 71% de la variación detectada puede atribuirse a diferencias entre los cultivares. El resto (29 %) representa diversidad genética dentro de cultivares. En base al coeficiente de diferenciación genética total entre los cultivares ( $G_{ST}$ ) el nivel de flujo génico estimado ( $Nm$ ) fue de 0.19. Esto indica que hay menos de un individuo migrante por generación entre las poblaciones, lo que también explica el alto nivel de diferenciación. Las actividades humanas, la adaptación a zonas agroecológicas, la distribución, colonización, sistema de apareamiento, tamaño de las poblaciones y el método de propagación a través de tubérculos-semilla afectan el nivel de diversidad genética entre y dentro de poblaciones (Hamrick y Godt, 1989, 1996; Sun *et al.*, 1996, 1997; Sun y Wong, 2001; Yasmin *et al.*, 2006).

### Análisis AMOVA

El Análisis de varianza molecular (AMOVA), usando agrupamiento jerárquico en base a origen, poblaciones, e individuos dentro de poblaciones, reveló diferencias genéticas significativas ( $p \leq 0.001$ ) entre los tres grupos utilizados en este estudio (Cuadro 4). Una contribución de 7 % de la variabilidad genética total se puede atribuir a diferencias entre los grupos, la que puede acreditarse a los grupos 1 y 3, relacionados a 'pool' genéticos europeos y mexicanos, respectivamente (Cuadro 4). La contribución más alta a la variabilidad genética total (62%) puede atribuirse al componente de la variación entre poblaciones dentro de grupos. En todas las comparaciones de grupos la mayor variación se debe a la fuente entre poblaciones dentro de grupos (Cuadro 4), lo que significa que entre variedades hay diferencias y que en menor grado se obtuvieron diferencias entre individuos dentro de poblaciones y la situación es similar para todas las comparaciones entre todos los grupos y la comparación entre los tres grupos.

the high variability detected. These results indicate the existence of genetic variability within the Mexican genetic pool.

Tollocan and Montserrat are reported as resistant to late blight. Since Tollocan and Cambray Rosa Morelos are highly divergent, these two varieties could be used as parents to start a breeding program introducing some interesting features from the creole into the bred cultivar.

### Genetic diversity and differentiation

The percentage of polymorphic *loci* (P) among cultivars was 86.23%. The coefficient of genetic differentiation among cultivars was high ( $G_{ST}= 0.71$ ), showing that about 71% of detected variation can be attributed to differences among cultivars. The rest (29 %) represents genetic diversity within cultivars. Based on the overall genetic differentiation coefficient among cultivars ( $G_{ST}$ ), the estimated level of gene flow ( $Nm$ ) was 0.19. This indicates that there is less of one migrant individual per generation among populations, which also explains the high differentiation level. Human activities, adaptation to agro-ecological zones, distribution, colonization, mating system, population size and propagation method through seed tubers affect the genetic diversity among and within populations (Hamrick and Godt, 1989, 1996; Sun *et al.*, 1996, 1997; Sun and Wong, 2001; Yasmin *et al.*, 2006).

### AMOVA analysis

Analysis of molecular variance (AMOVA) using hierarchical clustering based on origin, populations and individuals within populations revealed significant genetic differences ( $p \leq 0.001$ ) among the three groups used in this study (Table 4). A fraction of 7% of the overall genetic variability can be attributed to differences among groups, which may be assigned to groups 1 and 3, related to European and Mexican genetic pools respectively (Table 4). The highest contribution to the total genetic variability (62%) can be attributed to variation component among populations within groups. In all group comparisons most variation is due to the source among populations within groups (Table 4), meaning that there are differences among varieties and to a lesser extent, differences among individuals within populations were obtained and the situation is similar for all comparisons among all groups and the comparison among the three groups.

**Cuadro 4. Análisis de varianza molecular (AMOVA) realizado para 75 individuos del grupo 1 Europa, grupo 2 Norteamérica y grupo 3 México, usando 5 marcadores RAPD y 5 ISSR. Las abreviaciones indican: df= grados de libertad, SS= suma de cuadrados.**

**Table 4. Analysis of molecular variance (AMOVA) for 75 individuals from group 1 Europe, group 2 North America and group 3 Mexico, using 5 RAPD and 5 ISSR markers. The abbreviations indicate: df= degrees of freedom, SS= sum of squares.**

Fuente de variación	df	SS	Componente de varianza	(%) Variación total	Valor P <sup>x</sup>
Grupo 1 vs. 2 vs. 3	2	197.40	1.38	7%	***
Entre poblaciones dentro de grupos	12	841.15	12.72	62%	***
Individuos dentro de poblaciones	60	388.00	6.46	31%	***
Grupo 1 vs. grupo 2	1	56.69	0.00	0%	NS
Entre poblaciones dentro de grupos	5	333.93	12.00	64%	***
Individuos dentro de poblaciones	28	188.80	6.74	36%	***
Grupo 1 vs. grupo 3	1	148.48	2.28	11%	***
Entre poblaciones dentro de grupos	12	841.15	12.76	60%	***
Individuos dentro de poblaciones	56	351.20	6.27	29%	***
Grupo 2 vs. grupo 3	1	53.93	0.00	0%	NS
Entre poblaciones dentro de grupos	7	507.22	13.18	67%	***
Individuos dentro de poblaciones	36	236.00	6.55	33%	***

<sup>x</sup>= probabilidad; NS= no significativo; \* = 0.05; \*\* = 0.01; \*\*\* = 0.001. <sup>y</sup> = para detalles de los grupos ver Cuadro 1.

Los individuos dentro de las poblaciones contribuyeron con 31% de la variación genética total. Estos resultados sugieren que los 'pool' genéticos europeos y mexicanos pueden ser de gran importancia para proveer materiales superiores a programas de mejoramiento genético.

Esfahani *et al.* (2009) reportaron baja (5%) pero significativa ( $p \leq 0.002$ ) variabilidad genética atribuida a materiales de papa de origen americano y europeo cultivados en Irán. En adición, los mismos autores reportaron que la mayoría de la variabilidad genética puede acreditarse al componente entre poblaciones de papa. En contraste, Fu *et al.* (2009) demostraron la existencia de una reducida base genética en el germoplasma de papa de Canadá. Estos resultados realzan la importancia que tiene el analizar la estructura de las poblaciones para guiarse en la selección de materiales para el mejoramiento genético.

Al haber diferencias significativas entre grupos en los Cuadros 4 y 5 se detecta que existe variabilidad entre los grupos mexicano y europeo y sólo el grupo norteamericano no muestra tales diferencias, por lo tanto sí se presentan diferencias entre regiones, aunque también hay diferencias entre poblaciones.

El análisis de la diversidad genética AMOVA reveló diferencias significativas ( $p \leq 0.001$ ) entre los tipos de cultivar. Estas diferencias contribuyeron con 6% de variabilidad genética total (Cuadro 5). Las variedades criollas mexicanas mostraron un

Individuals within populations contributed 31% of the total genetic variation. These results suggest that European and Mexican genetic pools can be important as sources of superior materials for breeding programs.

Esfahani *et al.* (2009) reported low (5%) but significant ( $p \leq 0.002$ ) genetic variability attributed to American and European potato materials grown in Iran. In addition, the same authors reported that most genetic variability may be due to the component among potato populations. In contrast, Fu *et al.* (2009) showed the existence of a narrow genetic base in Canadian potato germplasm. These results highlight the relevance of population structure analysis to guide material selection for breeding.

Significant differences among groups in Tables 4 and 5 show variability among Mexican and European groups and only American group shows no such differences, therefore, differences exist among regions, although differences exist among populations too.

AMOVA analysis of genetic diversity revealed significant differences ( $p \leq 0.001$ ) among cultivar types. These differences contributed to 6% of the overall genetic variability (Table 5). Mexican landraces showed a relatively high genetic diversity (71%) among cultivars compared to bred cultivars (64%). These results suggest a high genetic diversity among Mexican landraces that

nivel relativamente alto (71%) de diversidad genética entre los cultivares en comparación con los cultivares mejorados (64%). Estos resultados sugieren que hay un alto nivel de diversidad genética entre las variedades criollas mexicanas que puede explotarse. La diversidad genética dentro de las poblaciones mexicanas fue más baja de lo esperado (29%) en comparación con los cultivares mejorados (36%). Probablemente las variedades criollas seleccionadas para este estudio pertenecen a aquellas más comúnmente cultivadas entre los agricultores locales, de tal modo que han sido sometidas a un proceso de selección a través de años que las ha hecho genéticamente más uniformes. Alternativamente, ello puede apuntar también a pérdida de genotipos debido a estrés biótico o abiótico, a actividades humanas, reemplazo por otros cultivos, migración de agricultores a otras zonas u otros factores.

can be exploited. Genetic diversity within Mexican populations was lower than expected (29%) compared to bred cultivars (36%). Probably, landraces selected for this study belong to those most commonly grown by local farmers, thus they have been bred over the years to become genetically more uniform.

Alternatively, this may result from loss of genotypes due to biotic or abiotic stress, human activities, replacement by other crops, and farmer migration to other areas or other factors.

European bred cultivars were significantly different from Mexican bred cultivars and landraces. The only North American cultivar included in this study was

**Cuadro 5. Análisis de varianza molecular (AMOVA) realizado para 75 individuos. Análisis de varianza molecular (AMOVA) realizado para 75 individuos del grupo 1 cultivares mejorados de Europa, grupo 2 cultivares mejorados de Norteamérica, grupo 3 cultivares mejorados de México y grupo 4 variedades criollas de México usando 5 marcadores RAPD y 5 ISSR. Las abreviaciones indican: df= grados de libertad, SS= suma de cuadrados.**

**Table 5. Analysis of molecular variance (AMOVA) for 75 individuals. Analysis of molecular variance (AMOVA) performed for 75 individuals in group 1 European bred cultivars, group 2 North American bred cultivars, group 3 Mexican bred cultivars and group 4 Mexican landraces based on 5 RAPD and 5 ISSR markers. Abbreviations indicate: df= degrees of freedom, SS= sum of squares.**

Fuente de variación <sup>y</sup>	df	SS	Componente de varianza	(%) variación total	Valor P <sup>x</sup>
Grupos 1+2+3 vs 4	1	112.90	1.15	6%	***
Entre cultivares dentro de grupos	13	925.65	12.94	63%	***
Individuos dentro de cultivares	60	388.00	6.46	31%	***
Cultivares mejorados					
Entre cultivares dentro de grupos	8	545.15	12.23	64%	***
Individuos dentro de cultivares	36	250.80	6.96	36%	na
Variedades criollas de México					
Entre cultivares dentro de grupos	5	380.50	14.07	71%	***
Individuos dentro de cultivares	24	137.20	5.71	29%	na
Grupo 1 vs. 2 vs. 3 vs 4	3	261.32	1.00	5%	***
Entre cultivares dentro de grupos	11	777.23	12.83	63%	***
Individuos dentro de cultivares	60	388.00	6.46	32%	***
Grupo 1 vs. 2	1	56.69	0.00	0%	NS
Entre cultivares dentro de grupos	5	333.93	12.00	64%	***
Individuos dentro de cultivares	28	188.80	6.74	36%	***
Grupo 1 vs. 3	1	97.11	2.06	10%	***
Entre cultivares dentro de grupos	6	396.73	11.88	58%	***
Individuos dentro de cultivares	32	214.00	6.68	32%	***
Grupo 1 vs. 4	1	140.45	2.30	11%	***
Entre cultivares dentro de grupos	10	714.43	13.08	61%	***
Individuos dentro de cultivares	48	289.20	6.02	28%	***

<sup>x</sup>= Probabilidad; na= no disponible; NS= no significativo; \* = 0.05; \*\* = 0.01; \*\*\* = 0.001. <sup>y</sup> =

**Cuadro 5. Análisis de varianza molecular (AMOVA) realizado para 75 individuos. Análisis de varianza molecular (AMOVA) realizado para 75 individuos del grupo 1 cultivares mejorados de Europa, grupo 2 cultivares mejorados de Norteamérica, grupo 3 cultivares mejorados de México y grupo 4 variedades criollas de México usando 5 marcadores RAPD y 5 ISSR. Las abreviaciones indican: df= grados de libertad, SS= suma de cuadrados (Continuación).**

**Table 5. Analysis of molecular variance (AMOVA) for 75 individuals. Analysis of molecular variance (AMOVA) performed for 75 individuals in group 1 European bred cultivars, group 2 North American bred cultivars, group 3 Mexican bred cultivars and group 4 Mexican landraces based on 5 RAPD and 5 ISSR markers. Abbreviations indicate: df= degrees of freedom, SS= sum of squares (Continuation).**

Fuente de variación <sup>y</sup>	df	SS	Componente de varianza	(%) variación total	Valor P <sup>x</sup>
Grupo 2 vs. 3	1	54.00	0.00	0%	NS
Entre cultivares dentro de grupos	1	62.80	10.91	57%	**
Individuos dentro de cultivares	12	98.80	8.23	43%	***
Grupo 2 vs. 4	1	55.32	0.00	0%	NS
Entre cultivares dentro de grupos	5	380.50	13.97	69%	***
Individuos dentro de cultivares	28	174.00	6.21	31%	***
Grupo 3 vs. 4	1	63.92	0.00	0%	NS
Entre cultivares dentro de grupos	6	443.30	13.53	68%	***
Individuos dentro de cultivares	32	199.20	6.22	32%	***

<sup>x</sup>= Probabilidad; na= no disponible; NS= no significativo; \* = 0.05; \*\* = 0.01; \*\*\* = 0.001. <sup>y</sup> =

Los cultivares mejorados de Europa fueron significativamente diferentes de los cultivares mejorados y variedades criollas mexicanos. El único cultivar de Norteamérica incluido en el presente estudio no fue significativamente diferente de los cultivares europeos y mexicanos (Cuadro 5). Tanto los cultivares mexicanos como los europeos han influido en gran proporción en la variabilidad genética atribuida al tipo de cultivar.

Debido a su rica diversidad, las variedades criollas necesitan conservarse y explotarse. Probablemente la conservación *ex.situ* es una buena opción dado que en este estudio se encontró baja diversidad dentro de los genotipos (Han *et al.*, 2007).

## Conclusiones

El uso de datos consenso basados en marcadores RAPD e ISSR reveló con éxito un alto nivel de diferenciación genética entre las poblaciones de papa estudiadas. La mayor parte de la variabilidad genética puede atribuirse a diferencias entre los cultivares de papa dentro de las regiones. El tipo de cultivar contribuyó en forma significativa a la variabilidad genética total. El 'pool' genético mexicano fue significativamente diferente del 'pool' genético europeo y ambos contribuyeron en forma significativa a la variabilidad

not significantly different from European and Mexican cultivars (Table 5). Both Mexican and European cultivars have contributed a large fraction of genetic variability attributed to cultivar type.

Because of its rich diversity, landraces need to be preserved and exploited. *Ex situ* conservation may be a good choice since low diversity within genotypes was found in this study (Han *et al.*, 2007).

## Conclusions

Consensus data based on RAPD and ISSR markers successfully revealed high genetic differentiation among potato populations studied. Most genetic variability can be attributed to differences among potato cultivars within regions. Farming type significantly contributed to the overall variability. Mexican genetic pool was significantly different from the European genetic pool and both contributed significantly to the total variability related to farming type. Mexican landraces are a rich source of genetic diversity and contributed significantly to genetic variability among cultivars.

*End of the English version*



total relacionada a tipo de cultivar. Las variedades criollas mexicanas son una fuente rica de diversidad genética y contribuyeron significativamente a la variabilidad genética entre cultivares.

## Agradecimientos

El primer autor le agradece al Dr. Héctor Lozoya Saldaña del Departamento de Fitotecnia de la Universidad Autónoma Chapingo (UACH), por proporcionar algunos materiales de papa.

## Literatura citada

- Bartish, I. V.; Jeppsson, N. and Nybom, H. 1999. Population genetic structure in the dioecious pioneer plant species *Hippophae rhamnoides* investigated by random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. *Mol. Ecol.* 8:791-802.
- Becerra, V. V. y Paredes, C. M. 2000. Uso de marcadores bioquímicos y moleculares en estudios de diversidad genética. *Agríc. Téc.* 60(3):270-281.
- Bornet, B. F.; Goraguer, G. J. and Branchard, M. 2002. Genetic diversity in European and Argentinian cultivated potatoes (*Solanum tuberosum* subsp. *tuberosum*) detected by inter-simple sequence repeats (ISSRs). *Genome* 45(3):481-484.
- Bussell, J. D. 1999. The distribution of random amplified polymorphic DNA (RAPD) diversity among populations of *Isotoma petraea* (Lobeliaceae). *Mol. Ecol.* 8:775-789.
- Dellaporta, S. L.; Wood, J. and Hicks, J. B. 1983. A plant DNA mini preparation: Version II. *Plant Mol. Boil. Rep.* 1(4):19-21.
- Douches, D. S. and Ludlam, K. 1991. Electrophoretic characterization of North American potato cultivars. *Amer. Potato. J.* 68:767-780.
- Esfahani, S. T.; Shiran, B. and Ghlolamreza, B. 2009. AFLP markers for the assessment of genetic diversity in European and North American potato varieties cultivated in Iran. *Crop Breed. App. Biotechnol.* 9:75-86.
- Ferroni, M. A. 1981. El potencial de la papa como recurso alimenticio y como fuente de ingreso. Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas, Programa Regional Cooperativo de Papa. Toluca, Estado. de México. Publicación especial Núm. 1. 30 p.
- Fu, Y. B.; Peterson, G. W.; Richards, K. W.; Tarm, T. R. and Percy, J. E. 2009. Genetic diversity of Canadian and exotic potato germplasm revealed by SSR markers. *Am. J. Pot. Res.* 86(1):38-48.
- Gopal, J. and Khurana, S. M. P. 2006. Handbook of potato production, improvement and postharvest management. The Haworth Press, Inc., 10 Alice Street, Binghamton, NY. 1-50 pp.
- Hamrick, J. L. and Godt, M. J. W. 1989. Allozyme diversity in plant species. In: *Plant population genetics, breeding and genetic resources*. Brown, A. H. D.; Clegg, M. T.; Kahler, A. L. and Weir, B. S. (Eds.). Sinauer. Sunderland, Massachusetts, USA. 43-63 pp.
- Hamrick, J. L. and Godt, M. J. W. 1996. Effects of life history traits on genetic diversity in plant species. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London.* 351:1291-1298.
- Han, Y. C.; Teng, C. Z.; Zhong, S.; Zhou, M. Q.; Hu, Z. L. and Song, Y. C. 2007. Genetic variation and clonal diversity in populations of *Nelumbo nucifera* (Nelumbonaceae) in Central China detected by ISSR markers. *Aquatic Bot.* 86(1):69-75.
- Hijmans, R. J. and Spooner, D. M. 2001. Geographic distribution of wild potato species. *Amer. J. Bot.* 88(11):2101-2112.
- Ispizua, V. N.; Guma, I. R.; Sergio, F. and Clausen, A. M. 2007. Genetic diversity of potato landraces from North western Argentina assessed with simple sequence repeats (SSRs). *Genet. Resour. Crop. Evol.* 54:1833-1848.
- Jaccard, P. 1908. Nouvelles recherches sur la distribution florale. *Bull. Soc. Vaudoise Sci. Nat.* 44:223-70.
- Jansky, S. and Hamermik, A. 2009. The introgression of 2x1EBN *Solanum* species into the cultivated potato using *Solanum verrucosum* as a bridge. *Genet. Resour. Crop Evol.* 56:1107-1115.
- Lunga 'ho, C.; cheminingua, N. G.; Yong, B. F.; Shibairo, S. I. and Hutchinson, M. J. 2011. Genetic diversity of Kenyan potato germplasm revealed by SSR markers. *Am. J. Pot. Res.* 88(5):424-434.
- McGregor, C. E.; Lambert, C. A.; Greyling, M. N.; Louw, J. H. and Warnich, L. 2000. A comparative assessment of DNA fingerprinting techniques (RAPD, ISSR, AFLP and SSR) in tetraploid potato (*Solanum tuberosum* L.) germplasm. *Euphytica* 113:135-144.
- Milbourne, D. R.; Meyer, J. E.; Bradshaw, E.; Baird, N.; Bonar, J.; Provan, W.; Powell, and Waugh, R. 1997. Comparison of PCR-based marker systems for the analysis of genetic relationships in cultivated potato. *Mol. Breed.* 3:127-136.
- Nei, M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 70:3321-3323.
- Nybom, H. and Bartish, I. V. 2000. Effects of life history traits and sampling strategies on genetic diversity estimates obtained with RAPD markers in plants. *Perspectives in Plant Ecol. Evol. System.* 3:93-114.
- Orona-Castro, F.; Pecina-Quintero, V. A.; Rocha-Peña, M. A.; Cadena-Hinojosa, O. O.; Martínez de la Vega, y Almeyda-León, I. H. 2006. Caracterización molecular de genotipos comerciales y elite de papa. *Agríc. Téc. Méx.* 2(32):171-180.
- Ovchinnikova, A.; Krylova, E.; Gavrilenko, T.; Smekalova, T.; Zhuk, M.; Knapp, S. and Spooner, D. M. 2011. Taxonomy of cultivated potatoes (*Solanum* section *petota*: Solanaceae). *Bot. J. Linnean Soc.* 165:107-155.
- Peakall, R. and Smouse, P. E. 2006. GenAEx 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Mol. Ecol. Notes* 6:288-295
- Powell, W.; Orozco-Castillo, C.; Chalmers, K. J.; Provanand, J. and Waugh, R. 1995. Polymerase chain reaction-based assays for the characterization of plant genetic resources. *Electroph.* 16:1726-1730.
- Prevost, A. and Wilkinson, M. J. 1999. A new system of comparing PCR primers applied to ISSR fingerprinting of potato cultivars. *Theor. Appl. Genet.* 98:107-112.
- Qaim, M. 1998. Transgenic virus resistant potatoes in Mexico: potential socioeconomic implications of North-South biotechnology transfer. ISAAA Briefs No. 7. ISAAA: Ithaca, NY. 48 pp.

- Rocha, E. A.; Paiva, L. V. de Carvalho, H. H. and Guimaraes, C. T. 2010. Molecular characterization and genetic diversity of potato cultivars using SSR and RAPD markers. *Crop Breed. App. Biotechnol.* 10: 204-210.
- Rohlf, F. J. 2000. *Programme NTSYS-pc: numerical taxonomy and multivariate analysis system: version 2.1.* Exeter Software, New York.
- Ross, H. 1986. Potato breeding - problems and perspectives. *J. Plant Breed. Supplement.* 13:1-132.
- Rousselle, P.; Robert, Y. and Crosnier, J. C. 1996. *La pomme de terre.* INRA édition, France (ITPT, ITCF) 224 p.
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). 2011. Servicio de información y estadística agroalimentaria y pesquera. Cultivo de papa. México, D. F. (consultado septiembre, 2012).
- Semagn, K.; Bjørnstad, Å. and Ndjiondjop, M. N. 2006. An overview of molecular marker methods for plants. *Afr. J. Biotechnol.* 5(25):2540-2568.
- Sun, M. 1996. Effects of population size, mating system, and evolutionary origin on genetic diversity in *Spiranthes sinensis* and *S. hongkongensis*. *Conserv. Biol.* 10:785-795.
- Sun, M. 1997. Genetic diversity in three colonizing orchids with contrasting mating systems. *Amer. J. Bot.* 84:224-232.
- Sun, M. and Wong, K. C. 2001. Genetic structure of three orchid species with contrasting breeding systems using RAPD and allozyme markers. *Amer. J. Bot.* 88(12):2180-2188.
- Ugent, D. 1968. The potato in Mexico: Geography and primitive culture. *Econ. Bot.* 22:108-123.
- Yasmin, S.; Islam, M. S.; Kondoker, M.; Nasiruddin, M. and Alam, S. 2006. Molecular characterization of potato germplasm by random amplified polymorphic DNA markers. *Biotechnol.* 5(1):27-31.
- Yeh, F. C.; Yai, R. C. and Boyle, T. 1999. *Popgene Version 1.31.* Microsoft Window-based Freeware for population genetics Analysis. Quick User Guide. Edmonton, Alberta, Canada, 28 p.