



UNIVERSIDAD
DE ATACAMA

ADN Vegetal de Atacama

Desarrollo de un kit de identificación genética para apoyar la Denominación de Origen de
Productos elaborados de aceituna Sevillana del Huasco y Chañar de Atacama

Código BIP 30432984-0



Proyecto Financiado con Aportes del Fondo de Innovación para la
Competitividad de Asignación Regional FIC-R 2015 del Gobierno
Regional de Atacama

Dr. Roberto Contreras Díaz
Director Proyecto FIC 30432984-0
Investigador CRIDESAT
Universidad de Atacama



INDICE

| | |
|---|-----------|
| 1.-INTRODUCCIÓN..... | 5 |
| 1.1.-La genética como herramienta de rastreo en alimentos | 5 |
| 1.2.-Bases genéticas | 5 |
| 1.3.-El uso del código genético para identificar y certificar materias primas | 6 |
| 1.4.-El ADN como una herramienta de trazabilidad en el procesamiento industrial de alimentos. | 7 |
| 1.5.-El Olivo | 8 |
| 1.5.1.-Variedad de olivo Sevillana del Valle del Huasco y Valle de Azapa. | 8 |
| 1.5.2.-Producción de aceite de oliva a nivel internacional y nacional. | 8 |
| 1.5.3.-Marcadores moleculares de ADN y Denominación de Origen (DO). | 9 |
| 1.6.-El chañar | 9 |
| 1.6.1.-Distribución geográfica, uso del chañar y estado de conservación | 9 |
| 1.6.2.-Extracción de ADN y uso de marcadores moleculares | 10 |
| 2.- OBJETIVOS | 12 |
| 2.1.-Objetivo General | 12 |
| 2.1.-Objetivos Específicos | 12 |
| 3.-MATERIALES y MÉTODOS | 13 |
| 3.1.-Colecta de material vegetal de chañar y olivo | 13 |
| 3.2.-Caracterización morfológica de frutos de olivo y chañar | 15 |
| 3.3.-Caracterización ambiental del Valle del Huasco, Valle de Azapa y Valle de Copiapó. | 16 |
| 3.4.-Olivo | 16 |
| 3.4.1.-Extracción de ADN de hojas y aceituna de olivo | 16 |
| 3.4.2.-Extracción de ADN de aceite de oliva | 17 |
| 3.4.3.-Amplificación ISSR | 17 |



| | |
|--|-----------|
| 3.4.4.-Amplificación RAPD | 18 |
| 3.4.5.-Amplificación SSR | 18 |
| 3.4.6.-Análisis estadístico | 19 |
| 3.5.-Chañar | 20 |
| 3.5.1.-Extracción de ADN de hojas y harina de chañar | 20 |
| 3.5.2.-Amplificación ISSR y RAPD | 21 |
| 3.5.3.-Amplificación SSR | 22 |
| 3.5.4.-Análisis de datos | 23 |
| 4.-RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 25 |
| 4.1.-Caracterización morfológica de frutos de olivo y chañar | 25 |
| 4.1.1.-Olivo | 25 |
| 4.1.2.-Chañar | 26 |
| 4.2.-Características ambientales del Valle de Azapa-LLuta, Valle de Copiapó y Valle de Huasco | 30 |
| 4.3.-Evaluación de métodos de extracción de ADN | 31 |
| 4.4.-Evaluación de marcadores moleculares de ADN en olivo | 36 |
| 4.4.1.-Análisis de perfil genético con marcadores ISSR y RAPD de 458 muestras de Sevillana del Huasco y variedades de olivos del resto de Chile. | 36 |
| 4.4.2.-Análisis de perfil genético de 40 muestras de aceite de oliva con marcador SSR. | 42 |
| 4.5.-Evaluación de marcadores moleculares de ADN en chañar | 43 |
| 4.5.1.-Análisis de perfil genético con marcador ISSR y RAPD de 466 muestras de ADN chañar de Copiapó y chañares del resto de Chile | 43 |
| 4.6.-Secuencias de ADN de Olivo y de Chañar | 48 |
| 4.6.1.-Análisis de secuencias de ADN de Olivo y de Chañar | 48 |
| 4.7.-Análisis de marcadores RAPD, ISSR y SSR de olivo | 50 |
| 4.8.-Análisis de marcadores RAPD e ISSR de chañar | 57 |
| 4.9.-Kit de identificación genética de aceituna y aceite de oliva | 66 |



| | |
|--|------------|
| 4.9.1.-Análisis de fragmento de 21 marcas de aceite de oliva extra virgen con marcador molecular SSR UDO99-011. Los gráficos muestran Señal de intensidad (eje Y) vs Pares de bases (eje x). | 67 |
| 4.9.2.-Análisis de fragmento de 21 marcas de aceite de oliva extra virgen con marcador molecular SSR DCA8. Los gráficos muestran Señal de intensidad (eje Y) vs Pares de bases (eje x). | 70 |
| 4.10.-Kit de identificación genética de frutos y harina de chañar | 77 |
| 4.10.1.-Análisis de fragmento de productos de PCR a partir de cinco harinas de chañar (Azapa, Pachica, San Pedro, Calama y Copiapó) con cinco marcadores moleculares SSR | 78 |
| 4.11.-Publicaciones científicas sometidas en revistas indexadas | 83 |
| 4.12.-Actividades de Difusión | 84 |
| 4.13.- Resumen de metas obtenidas por actividad según indicador de resultado | 98 |
| 5.-CONCLUSIONES..... | 102 |
| 6.-REFERENCIAS | 104 |
| 7.-ANEXOS..... | 111 |
| Anexo 1: Localización geográfica de muestras de olivos y chañar | |
| Anexo 2: Caracterización morfológica de frutos de olivo y chañar de diferentes localidades | |
| Anexo 3: Perfiles genéticos de electroforesis | |
| Anexo 4: Secuencias de ADN de olivo y chañar | |
| Anexo 5: Publicaciones científicas | |
| Anexo 6: Resumen Ejecución Financiera del proyecto | |



1.-INTRODUCCIÓN

1.1.-La genética como herramienta de rastreo en alimentos

El aumento de la demanda por mejores controles de calidad ha impulsado a los científicos a desarrollar herramientas moleculares fidedignas para los análisis alimenticios. Las herramientas genéticas presentan bases moleculares muy útiles para identificar especies biológicas, materias primas y alimentos procesados. La validación de la autenticidad de los alimentos depende en gran parte de los análisis proteicos y/o secuencias genéticas. Los métodos de base proteica incluyen ensayos inmunológicos, y técnicas electroforéticas y cromatográficas, como HPLC y TLC. Mientras estos métodos son efectivos en prueba de productos frescos, los métodos de base proteica tienen una menor efectividad cuando se aplican a los análisis de alimentos altamente procesados. En estos casos, los métodos de base genética son más eficaces y se pueden aplicar a las matrices de distintos alimentos. Además, el ADN brinda más información que las proteínas y se pueden encontrar en pequeñas trazas de material orgánico (Galimberti et al. 2013).

Debido a los recientes avances de biología molecular, los marcadores de ADN son el instrumento más eficaz en los análisis genéticos en variedades vegetales y razas animales, además de utilizarse para monitorear materias primas en los procesos industriales de alimentos (Mafra et al. 2008).

1.2.-Bases genéticas

En general, los métodos de base genética requieren marcadores de secuencias específicas de ADN que se pueden dividir en: marcadores basados en la hibridación y marcadores basados en la reacción en cadena de las polimerasas (PCR). En métodos basados en hibridación, los perfiles de especies específicas se descubren al hibridar ADN digerido por enzimas de restricción que se comparan con sondas etiquetadas (secuencia de ADN conocida). Los métodos basados en PCR requieren amplificar los locus objetivo utilizando cebadores (primers) específicos o arbitrarios, además de ADN y enzima polimerasa. Los fragmentos se separan con técnicas electroforéticas para luego detectar patrones de bandeo con distintos métodos de tinción, como una autoradiografía (Galimberti et al. 2013).

La elección del método molecular más apropiado depende de distintos aspectos, como la cantidad de variación de las especies analizadas, el tiempo requerido para el análisis y la relación costo eficacia. Además, las técnicas genómicas requieren ADN de alta calidad para trabajar con éxito, ya que su efectividad se puede influenciar de forma negativa por un ADN alterado o fragmentado. En relación a los sistemas basados en secuencias, SNP (polimorfismo de nucleótido simple) y SSR (secuencias simples repetidas) hoy en día se utilizan en gran parte por sus altos niveles de polimorfismo y alta reproducción. Estos métodos se utilizan tanto en la identificación de variedades vegetales, como razas animales y para la prevención de actividades comerciales fraudulentas (Hellberg y Morrisey 2011).



La investigación del código de barras genético en plantas terrestres se enfocó en el ADN de plastidios. Muchos de estos genomas se propusieron como regiones de códigos por mostrar un rápido porcentaje de evolución, como los más conservados genes de plastidios, *rbcl* o una sección del gen *matK*. El 2009, el Grupo de Trabajo de Planta CBoL (Consortio para el código de la vida) sugirió el uso de la combinación de los locus *rbcl* y *matK* como regiones centrales del código de barras genético, debido al alto porcentaje de recuperación de *rbcl* y la alta resolución de *matK* (Hollingsworth et al. 2009).

1.3.-El uso del código genético para identificar y certificar materias primas

La identificación de organismos es fundamental para garantizar estándares de alta calidad en industrias y mercados alimenticios. El código genético es eficaz para garantizar el origen y calidad de materias primas y la detección de adulteraciones que ocurren en las cadenas industriales de alimentos, como la mezcla de productos de diferentes taxones. Sin embargo, su funcionalidad se ve muy influenciada por la variabilidad molecular de los organismos, obteniendo un alto nivel de resolución cuando un organismo tiene un polimorfismo intra-específico bajo, lo que permite distinguirlos de taxones con alta similitud (Novak et al. 2007).

Las plantas son un elemento esencial en la alimentación humana de forma directa (como los cereales, que son la base de la pirámide alimenticia, seguidos de frutas y verduras) y de forma indirecta (como los productos forrajeros, que son alimento de ganado). Muchas plantas se usan como aditivos alimenticios, como la soya. Una identificación confiable de especies de cultivo, además de la procedencia y su rastreo son elementos clave en el campo de la seguridad alimenticia. En los últimos 20 años, se testearon muchos métodos PCR en cultivos de arroz, trigo, sorgo, cebada y centeno. Estos métodos son útiles para los fabricantes, quienes buscan proteger y certificar sus cosechas, y para los consumidores, quienes buscan la calidad y la procedencia de su alimento (Pasqualone et al. 1999).

Hoy en día, la investigación del código genético en el área botánica está cambiando el análisis funcional de distintos marcadores a otras aplicaciones más prácticas. En las plantas comestibles, éste método se usa para rastrear especias. Algunas de estas como las del género *Mentha*, *Ocimum*, *Origanum*, *Salvia*, *Thymus* y *Rosmarinus*, se analizaron utilizando la región de código central *matK + rbcL* y el espaciador intergénico *trnH-psbA*. El código genético, con *matK* y *trnH-psbA* muestra una alta funcionalidad en la discriminación de especies de albahaca, entre especies silvestres, cultivadas y sus orígenes. En frijol, el código genético discriminó haplotipos (combinación de alelos o conjunto de polimorfismos de nucleótido sencillo, SNPs, que se encuentra en el mismo locus) distintos entre frijoles de área Mesoamericana y Andina (Nicolè et al 2011; Galimberti et al. 2013).



Actualmente no existen limitaciones técnicas al aplicar el código genético en el rastreo de materias primas vegetales. Sin embargo, la reducida diversidad genética a nivel de cultivo a menudo requiere el análisis de grandes porciones de genoma, lo que repercute en una relación de costo-eficacia alta como para usarse de manera extensa.

1.4.-El ADN como una herramienta de trazabilidad en el procesamiento industrial de alimentos.

Un sistema ideal de trazabilidad (rastreo) debería seguir el historial de un producto desde su origen hasta el momento en que se consume, tomando en cuenta todas las etapas de transformación y comercialización. Los sistemas de rastreo e identificación molecular se desarrollaron para trabajar con materias primas. Sin embargo, las semillas, frutas y diferentes partes vegetales se transforman en alimentos con formas, sabores y aromas determinados a través de tratamientos físicos (calor, hervor y radiación UV) o químicos (adición de preservantes alimenticios o edulcorantes artificiales) que alteran la estructura genética. Por esta razón es necesario elegir bien la técnica genética en productos transformados, ya que el uso de una técnica incorrecta puede ser ineficaz por el nivel de degradación del ADN y la presencia de genomas de distintos organismos (Galimberti et al. 2013).

El ADN por lo general es más resistente a los procesos industriales que otras moléculas, como las proteínas (Martínez et al. 2003). Se pueden utilizar métodos de huella genética con éxito para identificar componentes vegetales, incluso en pequeñas trazas (Costa et al. 2010). No obstante, el procesamiento de los alimentos provoca alteraciones químicas y físicas, degradaciones y fragmentaciones (Bauer et al, 2003). La integridad del ADN influye de gran manera la efectividad de las metodologías moleculares (Hellberg y Morrisey 2011). Las secuencias de ADN mitocondrial y cloroplasto, se conserva en la mayoría de los alimentos procesados de derivados vegetales. Por ejemplo, a partir de ADN de plastidio se identificaron diferentes especies aromáticas después del secado y el trozado industrial. Además, los marcadores de ADN fueron efectivos para identificar té comercial, especies de frutas en yogures, y residuos de frutas, como plátanos en jugos, papillas y chocolates en galletas (Galimberti et al. 2013).

Muchos de los fraudes comerciales se relacionan con problemas taxonómicos, especies que las catalogan con un nombre local común pero que corresponde a un taxón distinto. Para evitar fraudes y etiquetados incorrectos, se debe especificar su correcto nombre científico junto al nombre local de la especie comestible. La técnica también tiene una alta efectividad al evaluar especies vegetales que actúa como alérgenos, tanto en alimentos frescos y procesados. De esta manera, se puede detectar especies vegetales y géneros en alimentos promotoras de gluten, para evitar que sea ingerido por celíacos (Galimberti et al. 2013).



1.5.-El Olivo

1.5.1.-Variedad de olivo Sevillana del Valle del Huasco y Valle de Azapa

A nivel mundial la variedad Sevillana del Huasco y de Azapa según el Catálogo de Variedades Olivícolas Internacionales es denominada “Azapa” (IOOC 2000). El olivo Azapa es una variedad de doble propósito para consumo de mesa y aceite, y sus características la diferencia de las demás variedades olivícolas a nivel internacional (Sotomayor 2000). Esta misma variedad está tipificada en el mercado de aceituna nacional como Sevillana “Tipo Azapa” y Sevillana “Tipo Huasco” (Hashiguchi 2005).

Esta variedad fue introducida en Perú por los colonos españoles en 1560. Dadas las circunstancias del transporte de estacas de olivos desde España se originaron considerables pérdidas de este material de propagación durante su trayecto (Molina 2015). Aun con tales dificultades los olivos fueron establecidos en aquel tiempo en el Valle de Azapa (perteneciente a Perú) y luego en Chile en el Valle del Huasco (Hidalgo 1993). En cuanto a la técnica de propagación, los cronistas mencionan que en América y también en Chile los olivos fueron propagados mayoritariamente por estacas y renuevos sacados desde la base del árbol, como también por semillas y por injerto (Molina 2015). Debido a las distintas técnicas de propagación, es posible que existan diferencias genéticas entre árboles de Azapa y Huasco, no habiendo certeza de la procedencia de estos genotipos, pudiendo ser clones de distintos olivos parentales de España.

1.5.2.-Producción de aceite de oliva a nivel internacional y nacional.

El consumo mundial de aceite de oliva muestra un crecimiento sostenido justificado principalmente por sus atributos favorables a la salud. La cuenca del mediterráneo es la principal productora y consumidora de aceite de oliva siendo España, Italia y Grecia los mayores proveedores del mercado mundial, produciendo en conjunto cerca de 3,1 millones de toneladas en 2012 y representando aproximadamente el 69% de la producción mundial, luego siguen otros países que colindan como Siria, Tunes, Turquía, Marruecos y Argelia representando el 24% de la producción mundial (Sudy and Cortés 2012, IOOC 2012). Mientras que un porcentaje menor a 6% de la producción mundial, es proveído por países sin tradición como productores olivícolas, donde se incluyen Chile, Argentina, Australia, Nueva Zelandia y Sudáfrica (IOOC 2012). La producción de aceite de oliva en Chile se ha incrementado exponencialmente, de 197 toneladas en 1997 a 21.000 toneladas en 2012 (ChileOliva 2012) y disminuyendo el 2015 a 18.500 toneladas (ChileOliva 2015). La superficie plantada de olivos en territorio nacional es de 25.000 hectáreas y dentro de las variedades aceiteras cultivadas se encuentran Arbequina (57%), Arbosana (20%), Frantoio y Leccino (10%), Picual (5%), Koroneiki (3%), Coratina (2%), Oliana (1%) y otras variedades (2%) (ChileOliva 2015) De este 2%, se encuentra una variedad nacional de doble propósito (aceite y mesa) introducida por los españoles en la época de la conquista, denominada, a nivel local y según la zona establecida como Sevillana del Huasco o Sevillana de Azapa.



1.5.3.-Marcadores moleculares de ADN y Denominación de Origen (DO).

Tradicionalmente para distinguir entre especies y variedades los descriptores morfológicos son los más usados, sin embargo, estos descriptores tienen la desventaja de estar influenciados por el ambiente (Ye et al., 2008; Busconi, 2006). La aplicación de la Reacción en Cadena de las Polimerasas (PCR, Polymerase Chain Reaction, Mullis y Faloona, 1987) y el desarrollo de la huella dactilar genética ha dado la posibilidad de identificar de manera precisa un cultivar o un clon específico (Busconi, 2006). Los marcadores moleculares más utilizados son los SSR (Simple Sequence Repeat, o STR Short Tandem Repeat), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), RAPD (Random Amplification of Polymorphic), ISSR (Inter Simple Sequence Repeat) and SCAR (Sequence Characterize Amplified Regions), entre otros. Los marcadores de ADN de polimorfismo amplificado aleatorio (RAPD) (Williams et al., 1990) son un sistema marcador prometedor ampliamente utilizado en investigación de plantas, como estudios filogenéticos, mapeo genético, huellas dactilares de ADN, fitomejoramiento y manejo de germoplasma. Este marcador es útil para el análisis de variedad y cultivar con ventajas de simplicidad, eficiencia, capacidad de detectar cantidades relativamente pequeñas de variación genética y no necesita información previa sobre el genoma. Al igual que RAPD, el ISSR (repetición de secuencia inter-simple) tiene una amplia gama de usos en el análisis genético; específicamente esta técnica de genotipado se basa en la variación encontrada en las regiones entre los microsatélites (Zietkiewicz et al. 1994). Son varios los trabajos de caracterización genética realizados en olivos, con los marcadores ISSR y RAPD, llevándose a cabo principalmente en países de la cuenca del mediterráneo (Claros et al 2000, Selsi and Yegenoglu 2017, Linos et al 2014).

La correcta identidad genética de árboles de olivo es considerado un factor clave de calidad en el rubro frutícola. Para la elaboración aceite de oliva extra virgen del Huasco con Denominación de Origen (DO), los olivicultores de esa misma localidad han establecido usar como requisito la variedad Sevillana del Huasco. De acuerdo a las indicaciones de INAPI, entre los requisitos más importantes a cumplirse para obtener la DO es fundamental que las características atribuibles al producto se deriven fundamentalmente o exclusivamente a su origen geográfico (INAPI 2017b). Por esto mismo los árboles centenarios de olivo de Azapa al igual que los olivos centenarios del Huasco (con más de 350 años) son individuos únicos a nivel mundial, y por ende materia prima importante para producir aceite de oliva en el caso del Valle del Huasco.

1.6.-El chañar

1.6.1.-Distribución geográfica, uso del chañar y estado de conservación

Geoffroea decorticans (Gillies ex Hook. Et Arn.) es un árbol nativo perteneciente a la familia Fabaceae (Lavin et al., 2001). Localmente conocida como "chañar", su distribución incluye las regiones semiáridas (Desierto de Atacama) en el norte de Chile, el Chaco paraguayo, el sur de Perú, Bolivia, el sur de Uruguay y el norte a centro sureste de Argentina (Squeo et al., 2008).



En Chile, esta especie leñosa habita valles y oasis desde las regiones de Arica-Parinacota hasta Coquimbo (Squeo et al., 2008), y es una de las especies arbóreas más comunes en los valles de Copiapó y San Pedro de Atacama. *Geoffroea decorticans* tiene múltiples usos y se considera un cultivo valioso y bien adaptado a las condiciones de las tierras áridas. En la Región de Atacama (Desierto de Atacama) de Chile, existen varios productos artesanales elaborados y consumidos a partir de plantas locales. Un ejemplo es el Chañar, cuyos frutos se consumen crudos o mediante la preparación de un jarabe denominado "arope" por la población local (Orrabalís et al., 2013; Reynoso et al., 2016). Este producto es muy deseable y se consume ampliamente por sus propiedades organolépticas. También muestra efectos como sedante, antitusivo, expectorante, anticatarral, balsámico, emoliente, antiasmático, antidiarreico y contra infecciones respiratorias y urinarias (Hurrell y Ulibarri 2011; Reynoso et al., 2016; Costagama et al., 2016). Recientemente, *G. decorticans* se evaluó como un cultivo de energía multipropósito en regiones semiáridas debido a su potencial como materia prima para la producción de pellets de biomasa y biodiesel (Santibañez y Vargas 2017).

Los genotipos chilenos de *G. decorticans* están bien adaptados a las condiciones áridas y semiáridas del desierto de Atacama. Habitan en una variedad de condiciones geográficas y ambientales, que varían desde bajas (ribera del río Copiapó y valle de Azapa) hasta áreas de gran altitud (San Pedro de Atacama) y suelos salinos (valle de Copiapó). Los recursos genéticos forestales en las zonas áridas de Chile están fragmentados y se reducen en extensión como resultado de la extracción indiscriminada y el uso insostenible (Gacitúa y Villalobos 2012). De acuerdo con Squeo et al. (2008), al chañar en la región de Atacama se le ha otorgado el estado de conservación "Vulnerable". Teniendo en cuenta su amplia distribución geográfica, su capacidad de adaptación a un rango de condiciones ambientales y su valor como cultivo de zonas áridas, la evaluación de la variabilidad genética de los genotipos de chañar en el norte de Chile presenta una pregunta de investigación categórica. A pesar de la importancia de esta especie, actualmente no hay estudios detallados sobre el Chañar, que sean necesarios para la caracterización de su material genético.

1.6.2.-Extracción de ADN y uso de marcadores moleculares

Entre las herramientas más utilizadas, los marcadores moleculares son muy útiles, dado que permiten rastrear la huella genética de cada organismo. El uso de marcadores de ADN se hizo posible con la llegada de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en los años 80, que fue fundamental en el desarrollo de las expectativas de la biología molecular (Mullis y Faloona, 1987).

Al igual que en Olivo, los marcadores moleculares RAPD e ISSR son muy utilizados en especies vegetales. Sin embargo, no existe ningún estudio genético de marcadores moleculares probados en *Geoffroea decorticans*, hasta la fecha. Entre los posibles análisis moleculares, la técnica de ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD) se utiliza para el estudio de polimorfismos genéticos en el ADN.



Consiste en la amplificación de segmentos de ADN genómico mediante PCR, utilizando oligonucleótidos cortos al azar como cebadores (Williams et al., 1990). Una alternativa es el uso de repeticiones de secuencias entre simples (ISSR), desarrolladas a partir de repeticiones de microsatélites (también denominadas repeticiones de secuencias simples, SSR) a través del recocido de cebadores específicos para esas repeticiones (Zietkiewicz et al., 1994). Por otro lado, los marcadores de SSR se han empleado en la identificación de variedades y demostraron ser muy efectivos para la autenticación de componentes de alimentos, tanto para especies animales como vegetales (Scarano y Rao, 2014). Así también, los genes de plastidios muestran un alto poder en la discriminación de especies de plantas, como las regiones *rbcl* y *matK* (Scarano y Rao, 2014)

Todos los estudios mencionados no serían posibles sin la extracción de ADN. A pesar de la aparente simplicidad del proceso, a menudo hay problemas con el rendimiento de cada método y la cantidad absoluta de ADN extraído, generalmente con contaminantes añadidos y degradación parcial. En particular, la calidad y la integridad del ADN aislado afectan directamente los resultados de todos los siguientes estudios científicos (Ginwal et al., 2010), ya que el exceso de restos celulares y proteínas puede alterar estos parámetros y así inhibir la PCR (Innis et al., 1990). Los polisacáridos y polifenoles, entre otros, son subproductos celulares que interfieren con la extracción y purificación del ADN, lo que afecta su posterior amplificación y clonación (Ginwal et al., 2010). La presencia de polisacáridos genera un producto final altamente viscoso, con textura similar a la cola, lo que dificulta su manejo con pipetas e inadecuado para la PCR debido a la inhibición de la actividad de la polimerasa Taq (Fang et al., 1992). Por todas estas razones, es esencial contar con un protocolo de extracción funcional, que dé como resultado buenos rendimientos, alta calidad y baja contaminación para evitar la inhibición de la PCR en análisis moleculares futuros.



2.- OBJETIVOS

2.1.-Objetivo General:

- Desarrollar I+D+i en sector productivo agrícola regional usando la identificación genética en alimentos a base de aceituna Sevillana del Huasco y Chañar (*Geoffroea decorticans*), para facilitar el proceso de denominación de origen y como valor agregado al proceso productivo.

2.1.-Objetivos Específicos:

- Estudiar características morfológicas de la aceituna Sevillana del Huasco (*Olea europaea*) y ecotipos de Chañar (*Geoffroea decorticans*) de Copiapó.
- Buscar marcadores de ADN en alimentos a base de aceituna Sevillana y Chañar.
- Desarrollar un kit de identificación genética para distinguir polimorfismos de ADN en alimentos a base de Chañar y Sevillana del Huasco.



3.-MATERIALES y MÉTODOS

3.1.-Colecta de material vegetal de chañar y olivo

Se colectaron frutos y hojas de las especies Chañar (*Geoffroea decorticans*) y olivo (*Olea europaea*) de la región de Atacama y otras regiones del país, a las cuales se registró su posición geográfica con GPS, y en laboratorio se registró la forma y tamaño de los frutos con cámara fotográfica. Como se había mencionado en el proyecto, si fuese necesario, se solicitará material vegetal de bancos de germoplasma certificados nacionales o extranjeros. Así también, en cuanto al chañar, en el proyecto se había contemplado solicitar material vegetal de chañar de otras partes del mundo. Sin embargo, el ingreso de material al país desde el extranjero está restringido por la normativa del SAG, cuyo material ya sea hoja, semilla o estacas, entre otros, requiere medidas cuarentenarias de protección para su estudio y posterior liberación dentro de territorio nacional, proceso que pueden tardar hasta 3 años. La normativa tiene como fin evitar el ingreso de insectos y/o microorganismos dañinos para la agricultura nacional. Por lo tanto, debido al largo periodo de espera para usar el material, decidimos no solicitarlo a países extranjeros, lo que no perjudicará el objetivo del proyecto porque el kit de identificación genética está dirigido al apoyo de la DO de los productos dentro del territorio nacional (como es mencionado en la reglamentación el INAPI, la institución concierne derechos de protección a nivel nacional, del cual se debe demostrar la asociación geográfica del producto dentro del territorio nacional, por lo tanto, las muestras del extranjero no son obligatorias para justificar la DO). Las muestras más utilizadas en este estudio se pueden observar en la Tabla 1 y en la Tabla 2:

A continuación se detalla la localización geográfica de las muestras de olivo y chañar muestreados en el proyecto:

- **Tabla 1 en Anexo 1:** 100 muestras de hoja y 100 muestras de frutos de Sevillana de 100 individuos del Valle del Huasco.
- **Tabla 2 en Anexo 1:** 100 muestras de hoja y 100 muestras de frutos de Sevillana de 100 individuos del Valle de Azapa.
- **Tabla 3 en Anexo 1:** Código de identificación de 54 variedades de olivo distinta a Sevillana del Huasco, colectados en la Estación Experimental INIA Huasco.
- **Tabla 4 en Anexo 1:** Lista de 21 marcas de aceites de oliva comercializados a nivel nacional.
- **Tabla 5 en Anexo 1:** 100 muestras de hoja y 100 muestras de frutos de Sevillana de 102 individuos de chañar del Valle de Copiapó.
- **Tabla 6 en Anexo 1:** 37 muestras de hoja y 50 muestras de frutos de Sevillana de 37 individuos de chañar del Valle del Huasco.
- **Tabla 7 en Anexo 1:** 45 muestras de hoja y 50 muestras de frutos de Sevillana de 45 individuos de chañar de la Región de Coquimbo.



- **Tabla 8 en Anexo 1:** 50 muestras de hoja y 50 muestras de frutos de Sevillana de 50 individuos de chañar de la Región de Antofagasta.
- **Tabla 9 en Anexo 1:** 50 muestras de hoja y 50 muestras de frutos de Sevillana de 54 individuos de chañar de la Región de Tarapacá.
- **Tabla 10 en Anexo 1:** 50 muestras de hoja y 50 muestras de frutos de Sevillana de 56 individuos de chañar de la Región de Arica-Parinacota.

Tabla 1: Coordenadas geográficas y edad de los olivos recolectados en el norte de Chile.

| Codigo | Nomenclatura | Latitud | Longitud | Edad (años) |
|------------------|--------------|--------------|--------------|-------------|
| Azapa Cent 1 | Azapa 1 | 18°30'38.9"S | 70°13'27.4"W | ~ 382* |
| Azapa Cent 2 | Azapa 2 | 18°30'39.0"S | 70°13'27.2"W | ~ 350* |
| Azapa Cent 3 | Azapa 3 | 18°30'39.1"S | 70°13'26.8"W | ~ 366* |
| Azapa Cent 4 | Azapa 4 | 18°30'39.2"S | 70°13'26.5"W | ~ 380* |
| Azapa 236 | Azapa 5 | 18°32'35.9"S | 70°07'45.3"W | ~ 160* |
| Azapa 203 | Azapa 6 | 18°30'23.9"S | 70°12'31.0"W | ~ 132* |
| Azapa 229 | Azapa 7 | 18°30'11.7"S | 70°15'14.8"W | ~ 158* |
| Azapa 189 | Azapa 8 | 18°30'26.8"S | 70°12'29.4"W | ~ 154* |
| Azapa 273 | Azapa 9 | 18°30'58.6"S | 70°12'33.9"W | ~ 170* |
| Azapa Cent 5 | Azapa 10 | 18°30'39.2"S | 70°13'26.1"W | ~ 345* |
| Las Quijadas 567 | Huasco 1 | 28°27'48.1"S | 71°11'10.4"W | 318-346** |
| Las Quijadas 572 | Huasco 2 | 28°27'48.1"S | 71°11'11.4"W | 318-346** |
| Las Quijadas 575 | Huasco 3 | 28°27'49.3"S | 71°11'12.7"W | 318-346** |
| La Glorieta 582 | Huasco 4 | 28°27'48.8"S | 71°10'58.8"W | 200-260** |
| La Glorieta 536 | Huasco 5 | 28°27'47.2"S | 71°10'54.8"W | 200-260** |
| Las Quijadas 565 | Huasco 6 | 28°27'48.1"S | 71°11'10.1"W | 318-346** |
| Las Quijadas 573 | Huasco 7 | 28°27'48.2"S | 71°11'11.3"W | 318-346** |
| Las Quijadas 578 | Huasco 8 | 28°27'50.2"S | 71°11'13.6"W | 318-346** |
| Las Quijadas 576 | Huasco 9 | 28°27'49.4"S | 71°11'12.7"W | 318-346** |
| Las Quijadas 574 | Huasco 10 | 28°27'49.7"S | 71°11'11.5"W | 318-346** |
| Arbequina | Arbequina | | | |
| Arbosana | Arbosana | | | |
| Barnea | Barnea | | | |
| Coratina | Coratina | | | |
| Empeltre | Empeltre | | | |
| Frantoio | Frantoio | 28°34'44.2"S | 70°47'53.8"W | ~ 60 |
| Koroneiki | Koroneiki | | | |
| Leccino | Leccino | | | |
| Liguria | Liguria | | | |
| Picual | Picual | | | |
| Sevillana INIA | Sev-inia | | | |

(*) Edad estimada de los olivos según el diámetro del tronco medido a 1.3 metros del suelo. Edad = $(2.11 \times \text{diámetro (cm)}) + 88.93$, cálculo realizado con la fórmula descrita por Arnan et al. (2012).

(**) Edad de olivos según un estudio dendrocronológico realizado por la Universidad de Concepción.

Tabla 2. Ubicación de individuos de *Geoffroea decorticans* recolectados del norte de Chile.

| Samples | Latitude (°S) | Longitude (°W) | Altitude (m) | Samples | Latitude (°S) | Longitude (°W) | Altitude (m) |
|---------|---------------|----------------|--------------|---------|---------------|----------------|--------------|
| AZ109 | 18°31'01.4"S | 70°10'53.9"W | 248 | CA348 | 22°27'51.2"S | 68°54'37.5"W | 2277 |
| AZ113 | 18°30'54.2"S | 70°11'22.0"W | 235 | CA350 | 22°27'51.1"S | 68°54'37.0"W | 2276 |
| AZ128 | 18°30'07.9"S | 70°14'56.1"W | 125 | COM06 | 27°26'38.9"S | 70°16'01.1"W | 460 |
| AZ139 | 18°30'02.3"S | 70°15'05.7"W | 119 | COM17 | 27°20'39.3"S | 70°21'46.0"W | 355 |
| CH278 | 18°48'08.6"S | 70°10'14.5"W | 278 | COP018 | 27°20'46.8"S | 70°21'36.3"W | 360 |
| CH280 | 18°48'10.1"S | 70°10'13.1"W | 277 | COM20 | 27°20'57.1"S | 70°21'22.9"W | 400 |
| CH282 | 18°48'10.8"S | 70°10'12.9"W | 280 | COP021 | 27°21'49.3"S | 70°19'42.7"W | 386 |
| PA289 | 19°51'51.4"S | 69°24'29.4"W | 1654 | CO477 | 27°20'13.4"S | 70°35'47.2"W | 198 |
| PA307 | 19°51'50.8"S | 69°24'35.7"W | 1649 | CO478 | 27°20'12.8"S | 70°35'47.2"W | 199 |
| PA316 | 19°51'48.8"S | 69°24'38.5"W | 1652 | CO479 | 27°20'12.2"S | 70°35'47.2"W | 201 |
| PA326 | 19°51'47.8"S | 69°24'38.8"W | 1648 | CO480 | 27°20'12.3"S | 70°35'45.1"W | 201 |
| PA336 | 19°51'46.4"S | 69°24'37.7"W | 1649 | CO481 | 27°20'12.3"S | 70°35'46.6"W | 201 |
| SP378 | 22°57'15.5"S | 68°13'47.8"W | 2398 | DES07 | 27°19'21.2"S | 70°50'39.8"W | 76 |
| SP381 | 22°57'15.2"S | 68°13'48.1"W | 2397 | DES35 | 27°19'02.2"S | 70°55'09.0"W | 6 |
| SP384 | 22°57'14.8"S | 68°13'46.9"W | 2395 | ADC091 | 28°46'42.5"S | 70°28'17.5"W | 829 |
| SP383 | 22°57'15.1"S | 68°13'46.9"W | 2396 | ADC084 | 28°46'38.3"S | 70°28'22.4"W | 822 |
| CA342 | 22°27'51.4"S | 68°54'37.4"W | 2288 | ADC087 | 28°46'41.5"S | 70°28'21.3"W | 825 |
| CA343 | 22°27'51.3"S | 68°54'37.9"W | 2281 | EL618 | 29°58'31.9"S | 70°58'33.1"W | 331 |
| CA346 | 22°27'52.6"S | 68°54'38.0"W | 2280 | CQ636 | 30°02'38.5"S | 70°42'55.4"W | 626 |

3.2.-Caracterización morfológica de frutos de olivo y chañar

Para la caracterización morfológica de los frutos de aceituna, se colectaron frutos maduros del Valle del Huasco (n=300) y Valle de Azapa (n=300). En cuanto a los frutos de chañar, se realizaron caracterizaciones morfológicas de frutos del Valle de Copiapó (n=100), del Valle de Azapa-LLuta (n=50), Pachica (n=50), Calama (n=50), San Pedro de Atacama (n=100) y Alto del Carmen (n=50). La caracterización morfológica, de cada fruto, consistió en medir con un vernier la altura desde la base hasta el ápice (h) y el diámetro ecuatorial (\emptyset), además con una balanza granataria se midió el peso (gr), como se observa en la Figura 1A y 1B. Los frutos provienen de huertos con similares manejos agrónomicos en las dos localidades.

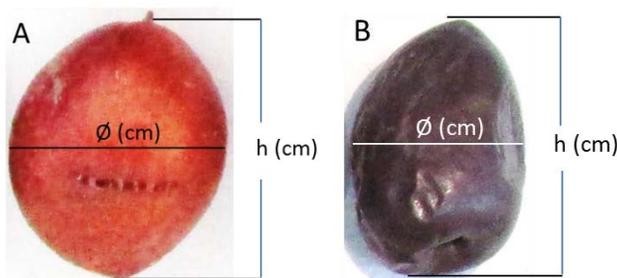


Figura 1: Imagen de fruto de chañar (A) y fruto de aceituna (B) al cual se midió el alto (h), diámetro (\emptyset) y peso (gr).



Para los análisis estadísticos, se calculó las diferencias significativas entre grupos mediante análisis ANOVA ($p < 0.05$) usando el programa PAST, las variables a evaluar fueron: peso, longitud y diámetro ecuatorial de frutos de cada localidad. Las diferencias significativas de las medias de cada grupo se presentaron con asterisco.

3.3.-Caracterización ambiental del Valle del Huasco, Valle de Azapa y Valle de Copiapó.

Se buscó información bibliográfica de las características ambientales del Valle del Huasco, Valle de Azapa y Valle de Copiapó, procedente de datos registrados por agencias o institutos nacionales del ámbito agrícola.

3.4.-Olivo

3.4.1.-Extracción de ADN de hojas y aceituna de olivo

La extracción de ADN se realizó con modificaciones de acuerdo al método de CTAB propuesto por Doyle y Doyle (1987). Se pesó 0,1 gramos de hojas o aceituna de cada variedad y se les aplicó nitrógeno líquido en mortero esterilizado. Luego, se homogenizó presionando fuertemente el tejido hasta dejar un polvo fino. El homogenizado es traspasado a un tubo de microcentrífuga de 2 mL y almacenado a -80°C . 100 mg de polvo homogenizado se mezcló con 700 μL de solución CTAB (100 mM Tris-HCl pH 8; 1,4 M NaCl; 20 mM EDTA; 2% CTAB) PVP-40 al 2% p/v precalentado a 65°C durante 15 minutos, junto con 4 μL de Proteinasa K y 14 μL de β -mercaptoetanol. Los tubos fueron agitados en Vortex (Scilogex) durante 10 segundos a máxima velocidad y luego incubados en baño térmico a 65°C por 60 min, invirtiéndolos cada 15 minutos. Luego, se centrifugó (Centrífuga Universal 320 R, Hettich) a 14.000 rpm durante 10 min a 4°C , el sobrenadante resultante se trasvasió a un nuevo tubo de 2 mL. Se agregó 700 μL de solución cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) y se mezcló invirtiendo suavemente los tubos por 2 min a temperatura ambiente. Se centrifugó nuevamente a 14.000 rpm durante 10 min a 4°C y luego se recuperó la fase superior, la que se trasvasió a un tubo de 1,5 mL. Al volumen recuperado (500 μL aproximadamente) se agregó 5 μL de 10mg/mL de RNAsa (Biotech) incubándose a 37°C por 30 min. Luego, se le agregó un volumen proporcional de 2/3 el volumen recuperado en cada tubo de isopropanol a -20°C (por ejemplo a un volumen de 500 μL se le agregó un volumen de 333 μL de isopropanol) y se mezcló invirtiendo 30 veces los tubos suavemente a temperatura ambiente; el contenido posteriormente se trasvasió con un volumen máximo de 650 μL a una columna con membrana de sílice (DNACOL-02 OMEGA). Se dejó reposar durante 4 min y luego se centrifuga a 10000 rpm por 1 min (Centrífuga 5424, Eppendorf) a temperatura ambiente y se descartó el líquido del tubo colector posterior a la centrifugación. A continuación, se lava la columna de sílice con 600 μL de solución de Alcohol al 70% v/v y acetato de amonio 10 mM, y se centrifuga a 10000 rpm por 1 min (Centrífuga 5424, Eppendorf) a temperatura ambiente, descartando nuevamente el líquido del tubo colector. Esta operación se repite una vez más. Luego se descarta el tubo colector y se coloca un nuevo tubo de 1,5 μL a la columna.



Se agrega a la membrana de sílice 30 μ L de buffer TE (10 mM Tris.HCl pH 7,8; 1 mM EDTA), y se incubó a 36°C durante 25 min y se centrifugó a 14000 rpm por 2 min (Centrífuga 5424, Eppendorf) a temperatura ambiente. Para evaluar la integridad del ADN se corrió por electroforesis 5 μ L de extracción de ADN con 2,5 μ L de buffer bromofenol en 1,2% de gel de agarosa (Cleaver Scientific), y para evaluar la concentración y contaminación del extracto de ADN se utilizó un COLIBRI microvolume spectrophotometer.

3.4.2.-Extracción de ADN de aceite de oliva

Para la extracción de ADN de aceite de oliva ensayamos cuatro protocolos, descritos por Ramos-Gómez et al. (2014), Consoladi et al. (2008), Busconi et al (2003) y Giménez et al., (2010). Los resultados previos demostraron que el protocolo del último autor fue el que ofreció mejor resultado, obteniendo una mayor cantidad de ADN y menor presencia de inhibidores de PCR. Sin embargo, a este mismo protocolo de Giménez et al (2010) le incluimos y fusionamos algunas metodologías de los demás autores mencionados, con el fin de mejorar mucho más la extracción de ADN.

De cada aceite de oliva (n=20) se extrajo 1.8 ml de aceite y se pasó a un tubo de 2 ml para luego centrifugar a 14.000 rpm (4°C) por 30 min. Desde la parte inferior del tubo se recuperó 500 μ l del aceite y se pasó a un tubo nuevo de 1,5 mL. El aceite se mezcló con 250 μ l de CTAB 2X (con 0,5% Tween 20 y 50 μ M DTT), más 250 μ l de hexano, y se agitó en Vortex por 10 seg. Luego se incubó a 60°C por 30 min en baño térmico. Posteriormente se agregó 500 μ l de cloroformo: isoamyl alcohol (24:1) puesto previamente a -20°C y se centrifugó 45 min a 14.000 rpm (4°C). Se recuperó sólo la fase superior con mucho cuidado (volumen entre 50 a 300 μ L) y se pasó a un nuevo tubo de 1,5 mL. Se agregó un volumen igual de isopropanol y 20 μ g/mL de Lineal Acrilamida, invirtiendo cuidadosamente los tubos 30 veces, hasta observar una mezcla homogénea, dejando incubado a -20°C toda la noche. Luego se centrifugó por 30 min a 14.000 rpm (4°C) y se eliminó el sobrenadante. Se lavó con 500 μ l de etanol y se centrifugó por 30 min a 14.000 rpm (4°C). Se eliminó el sobrenadante y se secaron los tubos a T° ambiente. Luego se agregó 20 μ l de TE y se incubó a 4°C toda la noche, y posteriormente cuantificar la concentración en un naonoespectrofotómetro.

3.4.3.-Amplificación ISSR

Para la amplificación de ISSR se seleccionaron los marcadores UBC826, UBC825 UBC810, UBC881, UBC807, UBC823 y UBC811 (University of British Columbia), que proporcionaron mayor número de bandas de PCR y mayor reproductibilidad con ADN de olivo. La reacción de PCR de 18 μ L consistió en: 9 μ L Master Mix DreamTaq (Thermo Fisher), 4 μ L de cebador ISSR (5 μ M) y 5 μ L de ADN genómico (2 ng/ μ L). Las amplificaciones fueron realizadas en un termociclador Swift Max Pro (ESCO) bajo las siguientes condiciones (de acuerdo a Claros et al 2000 con mínimas modificaciones): un paso inicial de 5 min a 94°C, 45 ciclos de 30 segundos a 94°C, 45 segundos a 52°C y 2 minutos a 72°C, seguido de un paso final de extensión de 6 minutos a 72°C.



Antes de comenzar el estudio se hicieron pruebas de los patrones generados por cada cebador ISSR, por duplicado, en muestras compuestas de tres individuos y muestras independientes. Esto con el fin de observar su reproducibilidad y consistencia en gel de agarosa a 1,7%, en TBE 0,5x durante 2 h a 100 V y teñido con bromuro de etidio. El gel fue puesto en un transiluminador UV (ilber Lourmat) y fotografiado con una cámara digital (Canon, SX160 IS) para realizar posteriormente los análisis.

3.4.4.-Amplificación RAPD

Para la amplificación de RAPD se seleccionaron los marcadores OPA-19 y OPC-09 que proporcionaron mayor número de bandas de PCR y mayor reproductibilidad con ADN de olivos. La reacción de PCR de 24 μ L consistió en: 12 μ L Master Mix SapphireAmp Fast PCR (Clontech), 4.8 μ L de cebador, .24 μ L de agua libre de nucleasas y 2 μ L de ADN genómico (2 ng/ μ L). Las amplificaciones fueron realizadas en un termociclador Swift Max Pro (ESCO) bajo las siguientes condiciones: un paso inicial de 1 min a 91°C, 35 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 36°C y 1 minuto y 30 segundos a 72°C, seguido de un paso final de extensión de 2 minutos a 72°C. Antes de comenzar el estudio se hicieron pruebas de los patrones generados por cada cebador RAPD, por duplicado, en muestras compuestas de tres individuos y muestras independientes. Esto con el fin de observar su reproducibilidad y consistencia en gel de agarosa a 1,7%, en TBE 0.5x durante 2 h a 100 V y teñido con bromuro de etidio. El gel fue puesto en un transiluminador UV y fotografiado con una cámara digital (Canon, SX160 IS) para realizar posteriormente los análisis.

3.4.5.-Amplificación SSR

Para la amplificación de SSR, utilizamos pares de cebadores visualizados en la Tabla 3. La reacción de PCR de 24 μ L consistió de la siguiente manera: 12 μ L Master Mix SapphireAmp Fast PCR (Clontech), 3.5 μ L de ADN genómico (5 ng / μ L) y volumen de cebadores para DCA8 y UDO99-043 fue de 1,2 μ L para cada cebador forward y reverse; mientras que el volumen de los cebadores para la múltiplex de PCR fue: 0,7 μ L para cada cebador de DAC11-DCA15, DCA3-DCA18 y GAPU89-UDO99011; y PCR multiplex con cebadores a 0.7 μ L y 1.3 μ L de GAPU103 y GAPU82, respectivamente; todos los cebadores se usaron a 5 μ M. Las amplificaciones se realizaron en un termociclador OptiMax de Labnet MultiGene en las siguientes condiciones: un paso inicial de 5 min a 94 ° C, 45 ciclos de 30 segundos a 94 ° C, 45 segundos a 52 ° C y 2 minutos a 72 ° C, seguido de un paso de extensión final de 6 minutos a 72 ° C. Para las reacciones de PCR con ADN de aceite, se utilizó un volumen de reacción de 34 μ L, con 30 ng de ADN. El programa de PCR fue de 95 ° C por 3 min, 40 ciclos de 98°C por 30 s, Tª (según autores Tabla N°3) de cada primer SSR por 30 s, 72°C por 30 s y una temperatura final de 72°C por 4 min.

Los productos de PCR se detectaron usando un analizador genético ABI3730XL (Applied Biosystems). Para la detección por electroforesis capilar, uno de los cebadores SSR (forward) se marcó con tinte de fluorescencia 5 '6-FAM y HEX, y el estándar de tamaño utilizado en el secuenciador fue Gene Scan™ 400 HDTM Rox (Applied Biosystems).



Los tamaños de alelos se determinaron mediante el uso del software Peak Scanner (Applied Biosystems, versión 1.0). El software MICROCHECKER v.2.2.3 (van Oosterhout et al., 2004) se utilizó para evaluar la posibilidad de errores de registro, alelo ausente (o baja intensidad de pico) y alelos nulos.

Tabla 3: Nombre del locus, marcado con tipo de fluorescencia, rango de tamaño de fragmentos amplificados (pb), número de alelos por locus (Na), heterocigosidad observada (HO), heterocigosidad esperada (He) e Índice de Fijación de Wright (F).

| Locus y Referencia | Secuencia de ADN (5' – 3') y tipo de fluorescencia | Rango de tamaño (pb) | Na | Ho | He | F |
|-------------------------------------|--|----------------------|------|-------|-------|--------|
| DCA11 Sefc et al. (2000) | F:5' FAM-TGAATCAACCCGTCAATAAGG-3' R:5' -TTGTCTCAGTGAACCCTTAAACC-3' | 131-161 | 6,0 | 0,267 | 0,702 | 0,620 |
| DCA15 Sefc et al. (2000) | F:5' HEX-GATCTTGTCTGTATATCCACAC-3' R:5' -TATACCTTTTCCATCTTGACGC-3' | 243-263 | 4,0 | 0,267 | 0,507 | 0,474 |
| DCA18 Sefc et al. (2000) | F:5' FAM-AAGAAAGAAAAAGGCAGAATTAAGC-3' R:5' -GTTTTCTGTCTCTACATAAGTGAC-3' | 165-177 | 7,0 | 1,000 | 0,816 | -0,226 |
| DCA3 Sefc et al. (2000) | F:5' HEX-CCCAAGCGGAGGTGTATATTGTTAC-3' R: 5' -TGCTTTTGTCGTGTTTGAGATGTTG-3' | 230-254 | 9,0 | 0,867 | 0,844 | -0,026 |
| DCA8 Sefc et al. (2000) | F:5' FAM-ACAATTC AACCTCACCCCATACCC-3' R:5' -TCACGTCAACTGTGCCACTGAACTG-3' | 130-146 | 6,0 | 0,933 | 0,782 | -0,193 |
| UDO99-011 Cipriani et al. (2002) | F:5' FAM-TGACTCCCTTTAAACTCATCAGG-3' R: 5' -TGCGCATGTAGATGTGAATATG-3' | 99-127 | 10,0 | 0,933 | 0,847 | -0,102 |
| UDO99-043 Cipriani et al. (2002) | F:5' HEX-TCGGCTTTACAACCCATTTC-3' R:5' -TGCCAATTATGGGGCTAACT-3' | 167-217 | 16,0 | 0,933 | 0,907 | -0,029 |
| GAPU89 Carriero et al. (2002) | F:5' HEX-GATCATTCCACACACGAGAG-3' R5' -AACACATGCCACAACTGA-3' | 157-205 | 7,0 | 0,867 | 0,711 | -0,219 |
| GAPU103 Carriero et al. (2002) | F:5' HEX-TGAATTTAACTTTAAACCCACACA-3' R5' -GCATCGCTCGATTTTTATCC-3' | 133-185 | 7,0 | 0,933 | 0,809 | -0,154 |
| GAPU82 Carriero et al. (2002) | F:5' FAM-TGAATCAACCCGTCAATAAGG-3' R5' -TGCTATTTGCACATCATTGTTT-3' | 182-184 | 2,0 | 0,000 | 0,320 | 1,000 |

3.4.6.-Análisis estadístico

Cada banda ISSR y RAPD se consideró como un carácter o locus independiente, y las bandas polimórficas se registraron como presencia (1) o ausencia (0) en cada individuo. Se realizaron tres ensayos independientes en cada gel, y solo se consideraron para el análisis aquellas bandas que fueron consistentes. La matriz binaria se aplicó para determinar la frecuencia de alelos corregida en base a Lynch y Milligan (1994). Se calculó el coeficiente de similitud de Jaccard. Sobre la base de la matriz de similitud genética, se realizaron análisis de conglomerados utilizando UPGMA y Neighbor joining con el programa PAST (Hammer et al., 2001) y bootstraps con 1,000 réplicas para probar la solidez de los dendrogramas. Además, para los análisis de agrupamiento de los árboles de olivo, el análisis de componentes principales (PCA) se realizó con el programa PAST.



Para evaluar la distribución porcentual de la variación genética entre y dentro de las poblaciones, se realizó un análisis de varianza molecular (AMOVA) utilizando el software GenALEx 6.5 (Peakall y Smouse 2012), para esto, se analizaron diez árboles centenarios de olivo de cada valle.

Aproximadamente 100 y 300 frutos de olivo fueron seleccionados de los valles de Huasco y Azapa, respectivamente. Se midió la longitud máxima desde la base y el ápice (cm), el diámetro ecuatorial (cm) usando un vernier, además del peso. La prueba t de Student ($p < 0.05$) se usó para determinar las diferencias significativas de la longitud del fruto y el diámetro ecuatorial de la fruta a partir de los frutos de dos localidades.

Los análisis filogenéticos con SSR se llevaron a cabo a partir del método de distancias genéticas de Nei (1973). Se construyeron dendrogramas empleando dos métodos de agrupamiento: UPGMA y Neighbour-Joining (NJ). Para ello se emplearon los programas SEQBOOT, GENDIST, NEIGHBOR y CONSENSUS todos pertenecientes al paquete de programas PHYLIP versión 3.6a2 (Felsenstein 2001). En todos los casos se llevó a cabo un análisis de “bootstrap” con 1000 réplicas, para determinar el grado de soporte estadístico de los agrupamientos. Generalmente, se considera que un grupo está apoyado de forma concluyente cuando el valor de “bootstrap” es mayor a 70, lo que generalmente corresponden a una probabilidad del 95% de consistencia del agrupamiento. Los dendrogramas fueron realizados usando el programa FigTree 1.4.0.

3.5.-Chañar

3.5.1.-Extracción de ADN de hojas y harina de chañar

Al principio se probaron 4 métodos de extracción de ADN de tejido de Chañar, el método CTAB-pellet; el método CTAB-Columns; con Kit comercial de extracción de ADN; y con método CTAB-Fenol-Columna. Finalmente nos quedamos con el último método que resultó mejor y que se describe a continuación. El ADN de hoja se extrajo utilizando el método CTAB modificado, que incluye columna de sílice. Las hojas jóvenes y frutos de chañar se transfirieron a morteros esterilizados y se trataron con nitrógeno líquido para solidificarlas, lo que permite la homogeneización a través de la presión firme del tejido hasta que se obtuvo un polvo ligero. Se pesaron 100 mg del polvo en un tubo de microcentrífuga de 2 ml, usando una espátula para la transferencia. Luego, 7 μ L de beta-mercaptoetanol, 4 μ L de 10 mg / ml de Proteinase K, 10 μ L de Sarkosyl al 5% y 700 μ L de CTAB precalentado a 65 ° C durante 15 min (PVP-40 al 4% p / v, 100 mM Tris-HCl pH 8; NaCl 1,2 M; EDTA 20 mM, CTAB al 2%) a cada tubo. Se agitaron con un vórtex (Scilogex) y luego se incubaron en un baño de agua durante 60 min a 65 ° C, invirtiendo los tubos cada 15 min. Los tubos se centrifugaron luego a 14000 rpm durante 10 min a 4 ° C (Centrífuga Universal 320 R Hettich), y la fase acuosa superior se tomó para un procesamiento adicional (~ 700 μ L) en un tubo nuevo. Se añadieron 800 μ l de solución de fenol / cloroformo / alcohol isoamílico UltraPure™ (25: 24: 1) a cada tubo y se mezclaron durante 10 min a 120 rpm en un incubador-sacudidor (Zhichengzhy-100B) a 20 ° C.



Estos tubos se centrifugaron a 14000 rpm durante 10 min a 4 ° C y la fase superior se recuperó para un procesamiento posterior (~ 550 µL), tratando de no perturbar la fracción inferior del tubo. Este sobrenadante fue transferido a un nuevo tubo. A continuación, se añadieron 5 µL de 10 mg/ml de RNAsa (Bio Basic) a cada tubo, seguido de incubación a 37 ° C durante 30 min. Se añadieron dos tercios de isopropanol a -20 ° C a los tubos (367 µL de isopropanol para 550 µL de solución en este caso), que luego se invirtieron 30 veces a temperatura ambiente para promover la mezcla. El líquido se transfirió luego a una mini columna Hi-Bind DNA (Omega Bio-tek) unida a un tubo de recogida de 2 ml y se dejó incubar durante 2 minutos a temperatura ambiente. Las minicolumnas se centrifugaron a 14000 rpm durante 2 min y todo el precipitado se descartó. Luego se lavaron una vez con 700 µL de etanol al 90% a temperatura ambiente, se centrifugaron a 14000 rpm durante 2 min y el precipitado se descartó. Esto fue seguido de la adición de 700 µL de etanol al 70% con NH₄OAc 10 mM a temperatura ambiente, centrifugación a 14000 rpm durante 2 min y descarte del precipitado. Las minicolumnas vacías se centrifugaron a 14000 rpm durante 2 minutos para eliminar el etanol restante y el tubo de recogida se reemplazó por un nuevo tubo de 1,5 ml. Se añadieron 60 µL de TE precalentado a 65 ° C a cada mini columna, seguido de incubación a 65 ° C durante 5 min. Finalmente, los tubos se centrifugaron a 14000 rpm durante 2 min, se descartó la mini columna y el tubo de 1,5 ml con el extracto se almacenó a -20 ° C para su uso posterior. La calidad y la concentración del ADN total se verificaron mediante el espectrofotómetro Colibri Microvolume (Titertek Berthold, Alemania) a 260, 280 y 230 nm, y se verificó la integridad del ADN genómico en un gel de agarosa al 0,7%.

3.5.2.-Amplificación ISSR y RAPD

Ocho ISSR y tres primers RAPD, de un total de nueve (UBC 807, UBC 810, UBC 811, UBC815, UBC817, UBC823, UBC826, UBC880 y UBC864) y ocho (OPM-12, OPX-04, OPP-18, OPA -19, OPAi-14, OPB-19, OPH-19 y OPJ-18), respectivamente, fueron seleccionados en función del número de bandas y su reproducibilidad. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con ISSR se llevó a cabo en un volumen total de 24 µL que contenía 12 µL de SapphireAmp Fast PCR Master Mix 2X (Takara), 5 µL de cebador (5 µM), 2.5 µL de ADN genómico total (1 ng µL⁻¹) y 4.5 µL de agua libre de nucleasas (Thermo Scientific). La amplificación se realizó en un termociclador Swift MaxPro (ESCO) en las siguientes condiciones: una desnaturalización inicial a 94 °C durante 3 minutos, seguida de 45 ciclos de 5 segundos a 98 °C, 5 segundos a 52 °C y 40 segundos a 72 °C, con una extensión final a 72 °C durante 4 min. Las PCR con RAPD se llevaron a cabo en un volumen total de 24 µL que contenía 12 µL de SapphireAmp Fast PCR Master Mix 2X (Takara), 5 µL de cebador (5 µM), 5 µL de ADN genómico total (1 ng µL⁻¹) y 2 µL de agua sin nucleasas (Thermo Scientific). Las amplificaciones RAPD se realizaron en las siguientes condiciones: una desnaturalización inicial a 91 °C durante 1 min, seguida de 35 ciclos de 1 min a 91 °C, 1 min a 36 °C y 1,5 min a 72 °C, con una extensión final a 72 °C por 2 min. Los productos de PCR se mezclaron con tampón de carga y se separaron mediante electroforesis en gel sobre gel de agarosa al 1,8% (p / v) con 4,5 µl de bromuro de etidio (10 mg ml⁻¹), en 0,5X TBE a 100 V durante 110 min. Finalmente, los fragmentos de ADN se visualizaron en transiluminador UV y se fotografiaron.



3.5.3.-Amplificación SSR

Se evaluaron 11 microsatélites de *Geoffroea spinosa* descritos por Naciri-Graven et al. (2005) para probarlos y usarlos en los primeros ensayos de PCRs con ADN de *Geoffroea decorticans*. Finalmente, se seleccionaron ocho microsatélites que mostraron buena amplificación en chañar (*Geoffroea decorticans*) de acuerdo al tamaño esperado, pero, de estos, sólo cinco loci fueron utilizados en los análisis debido a que se observó un mayor contenido de información polimórfica. Concretamente los cinco loci seleccionados fueron: Gsp.B264, Gsp.A021, Gsp.A149, Gsp.B284 y Gsp.A104. Todas las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un volumen total de 20 μ L, el cual contenía 10 μ L de DreamTaq PCR Master Mix 2X (Thermo Scientific), 1 μ L de primer forward (5 μ M), 1 μ L de primer reverse (5 μ M) y 8 μ L de ADN genómico total (1 ng / μ L). La amplificación se realizó en un termociclador Swift MaxPro (ESCO) con las siguientes condiciones una desnaturalización inicial a 94°C durante 4 minutos, seguida de 45 ciclos de 35 segundos a 94°C, 35 segundos a T° indicada por cada SSR en Naciri-Graven et al (2005), y 35 s a 72°C, con una extensión final a 72°C durante 4 min.

Los productos de PCR se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 1,8% (p / v) con 4,5 μ l de bromuro de etidio (10 mg ml⁻¹), en 0,5X TBE a 100 V durante 110 min. Finalmente, los fragmentos de ADN se visualizaron en transiluminador UV y se fotografiaron. Por otro lado, en un secuenciador automático ABI 377 se registraron los tamaños de alelos de cada individuo de chañar, en relación con un estándar de tamaño interno conocido, Genescan-400 Rox (Applied Biosystems), utilizando el software Peak Scanner (Applied Biosystems, versión 1.0).



Tabla 4: Nombre del locus, secuencia y tipo de fluorescencia, motivo del microsatélite, amplificación esperada, amplificación con nuevos primers y referencia de los microsatélites.

| Locus | Secuencia de ADN (5' – 3') y fluorescencia (FAM o HEX) | Motivo | Amplificación esperada con primers originales (*) | Amplifica con nuevos primers | Referencia de primers |
|----------|--|---|---|------------------------------|-----------------------------|
| Gsp.G226 | F:5'HEX-GCTGCCTTGATTTTCGATGCAAATGCT-3' R:5'-GCCCTTTCCTAAACCTCACTGCCC-3' | (TC) ₂₂ | NO | SÍ | Primers propios |
| Gsp.F119 | F:5'FAM-GGCTAAATCTGGCTCACTTG-3' R:5'-GATGATGAATTTGGGTCTCC-3' | (CA) ₁₀ | SÍ | - | Naciri-Graven et al. (2005) |
| Gsp.A149 | F:5'HEX-GAGTGGAGTCACAGAAAAACAG-3' R:5'-CAAATCTTGAAACTCGGAACC-3' | (GA) ₁₅ | SÍ | - | Naciri-Graven et al. (2005) |
| Gsp.B284 | F:5'FAM-AGCCCATCTTGGGGATGAGCCT-3' R: 5'-TGCATCCCTCTCTTCTGGCGTC-3' | (TC) ₈ (TATG) ₂ | NO | SÍ | Primers propios |
| Gsp.A021 | F:5'FAM-CACAACAGTAGGATTGTTTGTCA-3' R:5'-TCCATACTTTATCATCTTTCTCTCCT-3' | (TA) ₄ (TG) ₁₄ | NO | SÍ | Primers propios |
| Gsp.I168 | F:5'-ATGTGCAATGCCCACTAAC-3' R: 5'-AAGAAGAACCTAATGATGG-3' | (CT) ₃₄ | NO | NO | Naciri-Graven et al. (2005) |
| Gsp.B264 | F:5'FAM-AACACTCAGGTTGGCGTGC-3' R:5'-AGCAGCCACTAATACACAAG-3' | (CT) ₁₄ (AT) ₂ | SÍ | - | Naciri-Graven et al. (2005) |
| Gsp.B291 | F:5'-GTTGACTGTTTATTACCTTCTC-3' R:5'-TCAGCGTAACAATTCAGAATG-3' | (CT) ₃₇ (CA) ₁₀ C TCA(CT) ₃ | NO | NO | Naciri-Graven et al. (2005) |
| Gsp.A104 | F:5'HEX-AAGCAGGTTGCCAACATGG-3' R:5'-GCGAACATTTTCAAGAGATCG-3' | (GT) ₁₁ y (GA) ₈ | SÍ | - | Naciri-Graven et al. (2005) |
| Gsp.B458 | F:5'FAM-TCACTGATTTATTTGTGTAGTGG-3' R:5'-TAACGGTTCTACGTGCCTTTGT-3' | (CA) ₁₀ (TA) ₆ | NO | SÍ | Primers propios |
| Gsp.B331 | F:5'-TACATTGATTTTGTGTGGAC-3' R:5'-GTTTGAGTTATTGAAGTTCTTA-3' | (CA) ₁₄ TG(CA) ₄ | NO | NO | Naciri-Graven et al. (2005) |

(*) Naciri-Graven et al. (2005)

3.5.4.-Análisis de datos

Cada una de las bandas ISSR y RAPD se consideraron como un carácter independiente o locus, y las bandas polimórficas se registraron como presentes (1) y ausentes (0) para cada uno de los 38 individuos. Se realizaron tres evaluaciones independientes en cada gel, y solo se consideraron las bandas con registro constante para el análisis. Fue estimado el número total de bandas ISSR (número total de bandas, TNB), porcentaje de bandas polimórficas (P%) al 99%, número de genotipos diferentes (NG), poder resolutivo (Rp) y número de bandas privadas (NPB) obtenidas con cada cebador. La Potencia de resolución (Rp) de un cebador se calculó como $R_p = \sum I_b$, donde I_b (informativo de banda) toma el valor de: $1 - [2 \times (0.5 - p)]$, p es la frecuencia de las líneas que contienen la banda.



El contenido de información polimórfica (PIC) se estimó como $PIC = 2p(1-p)$.

La matriz binaria se aplicó para determinar la frecuencia de alelos corregida en base a Lynch y Milligan (1994). Se generó una matriz de distancia genética por pares entre nueve poblaciones (38 individuos) utilizando el enfoque de Nei en el software GenAlEx 6.5 (Peakall y Smouse 2012). Para evaluar la distribución porcentual de la variación genética entre y dentro de las poblaciones, se realizó un análisis de varianza molecular (AMOVA) utilizando el software GenAlEx 6.5. La correlación de significancia entre las matrices de distancia geográfica y genética se evaluó mediante una prueba de Mantel en el software GenAlEx 6.5, y el valor se obtuvo mediante el cálculo de 999 permutaciones al azar. Con base en la matriz de similitud genética, se realizaron análisis de conglomerados utilizando UPGMA con el programa PAST (Hammer et al., 2001); bootstraps de 1,000 réplicas se realizaron para probar la solidez de los dendrogramas. El análisis de componentes principales (PCA) se realizó en el programa PAST para los análisis de agrupamiento de las muestras de *G. decorticans*.

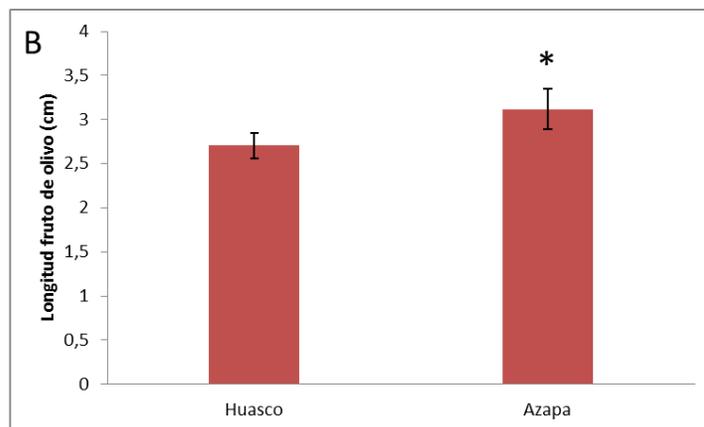
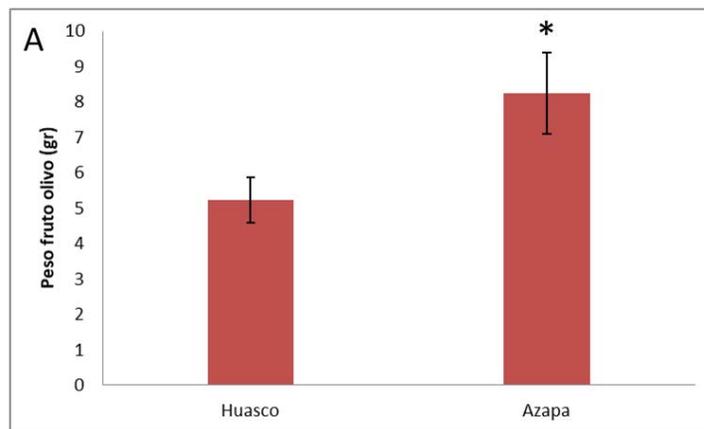
La diversidad genética se calculó para los loci marcadores bialélicos de ADN usando el índice de diversidad Shannon-Weaver relativo (H) (Hutchenson 1970): $H = - (p_i \ln [p_i] + q_i \ln [q_i])$, donde p es la frecuencia para amplificación de marcadores y q la frecuencia del alelo nulo (Kolodinska et al., 2004). Se calculó el índice de diversidad de Shannon-Weaver para cada cebador en nueve poblaciones: Azapa, Chaca, Pachica, San Pedro, Calama, Copiapó, ribera del río Copiapó, Alto del Carmen y Coquimbo. Con los datos del índice de diversidad Shannon-Weaver, se realizó un ANOVA de un factor, seguido de una prueba de Tukey, para comparar la variación genética de la población.

4.-RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1.-Caracterización morfológica de frutos de olivo y chañar

4.1.1.-Olivo

Las aceitunas de Huasco (III Región) y Azapa (XV Región) mostraron diferencias significativas ($p < 0.05$) en cuanto al peso del fruto, con un promedio de 5,22 gr y 8,23 gr, respectivamente. Así también se observó diferencias significativas ($p < 0.05$) de la longitud del fruto con un promedio de 2,70 cm y 3,12 cm, respectivamente (Figura 2A y 2B) y el diámetro del fruto, con un promedio de 1,88 cm y 2,1 cm, respectivamente (Figura 2C). Estos resultados dejan en evidencia el mayor tamaño significativo ($p < 0.05$) de las aceitunas de Azapa con respecto a las aceitunas del Huasco (ver imágenes de frutos en **ANEXO 2**).



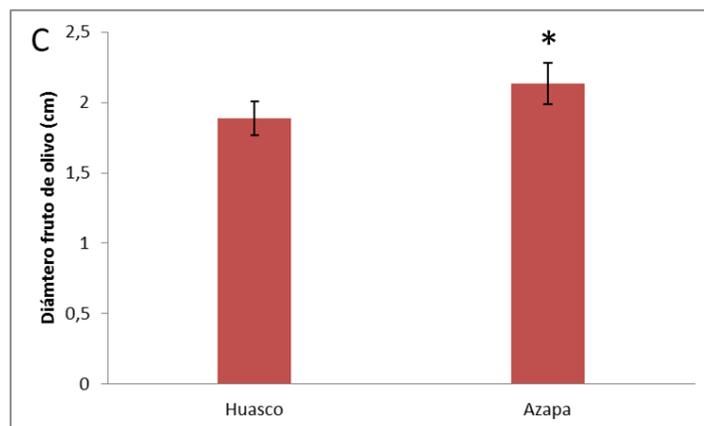


Figura 2: Promedio del peso (A), longitud (B) y diámetro (C) de 300 frutos de olivo del Valle del Huasco y 300 frutos de olivo del Valle de Azapa. Las barras muestran en la parte superior una línea representando la desviación estándar ($DS\pm$), y las diferencias significativas ($p < 0.05$) se representa con asterisco (*).

4.1.2.-Chañar

En la Figura 3 se observa el promedio del diámetro de los frutos de chañar procedente de seis localidades, en cuanto a esto, se realizó un análisis ANOVA (Tabla 5), demostrando que existen diferencias significativas ($p < 0.05$) del diámetro de los frutos entre las seis localidades. El test de comparaciones múltiples (Tukey) mostró que el diámetro de los frutos de Azapa es significativamente mayor con 2,63 cm comparado con el resto de las localidades (Pachica, Calama, San Pedro, Copiapó y Alto del Carmen). El cuanto a los frutos del valle de Copiapó, estos son significativamente de diámetro más pequeño con 1,98 cm, comparado con los frutos de San Pedro de Atacama, Alto del Carmen y Azapa, pero, es significativamente similar al diámetro de los frutos de Pachica y Calama (ver imágenes de frutos en **ANEXO 2**).

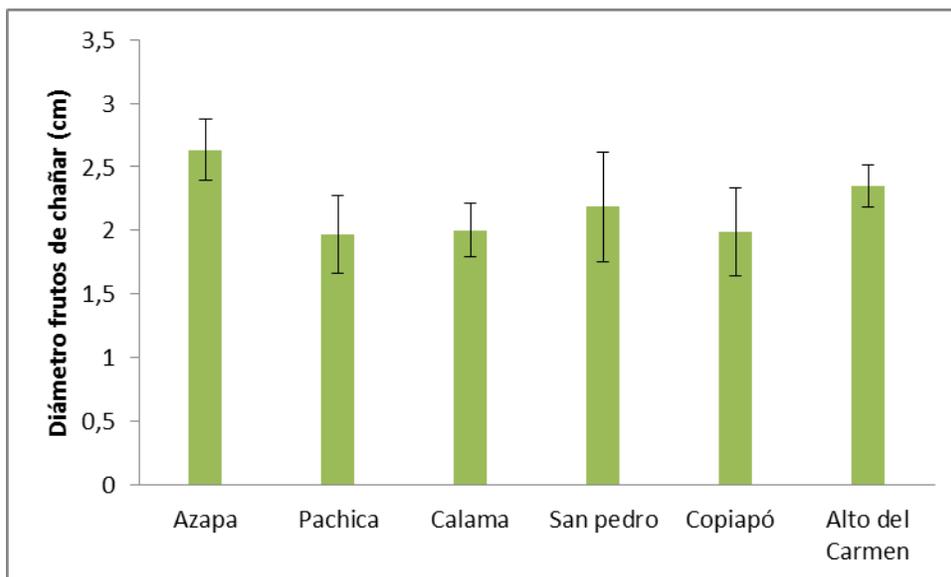


Figura 3: Promedio de diámetro de frutos de chañar de seis localidades. Las barras muestran en la parte superior una línea representando la desviación estándar (DS±).

Tabla 5: ANOVA y Prueba de Tukey de datos obtenidos del diámetro de fruto de chañar de seis localidades.

| <i>F.V.</i> | <i>S.C.</i> | <i>g.l.</i> | <i>M.C.</i> | <i>F</i> | <i>Sig.</i> |
|----------------------|-------------|-------------|-------------|----------|-------------|
| Entre grupos | 19,0436 | 5 | 3,8087 | 36,54 | 9,55E-31 |
| Dentro de los grupos | 41,0594 | 394 | 0,1042 | | |
| Total | 60,10310 | 399 | | | |

Prueba de Tukey

| | Azapa | Pachica | Calama | San Pedro | Copiapó | AC |
|-----------|-------|----------|----------|-----------|----------|----------|
| Azapa | | 2,03E-05 | 2,03E-05 | 2,03E-05 | 2,03E-05 | 3,29E-05 |
| Pachica | 15,95 | | 0,9935 | 0,003768 | 0,9996 | 2,03E-05 |
| Calama | 15,16 | 0,7918 | | 0,0256 | 0,9999 | 2,04E-05 |
| San Pedro | 10,81 | 5,142 | 4,35 | | 0,01134 | 0,06759 |
| Copiapó | 15,52 | 0,4367 | 0,3551 | 4,705 | | 2,04E-05 |
| AC | 6,935 | 9,017 | 8,225 | 3,875 | 8,581 | |

En la Figura 4 se observa el promedio de la longitud de los frutos de chañar procedente de seis localidades. Se realizó un análisis ANOVA (Tabla 6) entre grupos, demostrando que existen diferencias significativas ($p < 0.05$) de la longitud de los frutos entre las seis localidades. El test de comparaciones múltiples (Tukey) mostró que la longitud de los frutos de Alto del Carmen es significativamente mayor con 2,97 cm comparado con los frutos de cuatro localidades (Copiapó, San Pedro de Atacama, Calama y Pachica) y significativamente similar al de Azapa. El cuanto a los frutos del valle de Copiapó, estos son significativamente de longitud más corta con 2,39 cm, comparado con los frutos de San Pedro de Atacama, Alto del Carmen y Azapa, pero, es significativamente similar a la longitud de los frutos de Pachica y Calama.

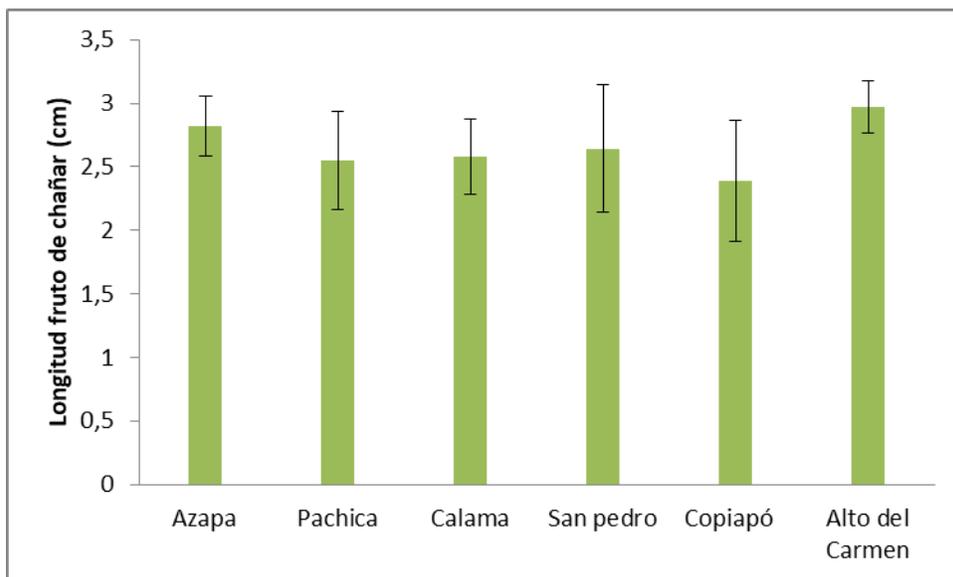


Figura 4: Promedio de la longitud de frutos de chañar de seis localidades. Las barras muestran en la parte superior una línea representando la desviación estándar (DS±).

Tabla 6: ANOVA y Prueba de Tukey de datos obtenidos de la longitud de fruto de chañar de seis localidades.

| F.V. | S.C. | g.l. | M.C. | F | Sig. |
|----------------------|---------|------|--------|-------|----------|
| Entre grupos | 13,8284 | 5 | 2,7656 | 17,06 | 2,77E-15 |
| Dentro de los grupos | 63,8632 | 394 | 0,1620 | | |
| Total | 77,6917 | 399 | | | |

Prueba de Tukey

| | Azapa | Pachica | Calama | San Pedro | Copiapo | AC |
|-----------|-------|----------|---------|-----------|----------|-----------|
| Azapa | | 0,002987 | 0,01322 | 0,1397 | 2,04E-05 | 0,3252 |
| Pachica | 5,229 | | 0,9984 | 0,8126 | 0,2519 | 2,04E-05 |
| Calama | 4,641 | 0,5887 | | 0,9615 | 0,1006 | 2,17E-05 |
| San Pedro | 3,463 | 1,766 | 1,177 | | 0,008274 | 0,0001254 |
| Copiapo | 8,298 | 3,069 | 3,657 | 4,835 | | 2,03E-05 |
| AC | 2,871 | 8,1 | 7,511 | 6,334 | 11,17 | |

En la Figura 5 se observa el promedio del peso de los frutos de chañar procedente de seis localidades. Se realizó un análisis ANOVA (Tabla 7) entre grupos, demostrando que existen diferencias significativas ($p < 0.05$) del peso de los frutos entre las seis localidades. El test de comparaciones múltiples (Tukey) mostró que el peso de los frutos de Azapa es significativamente mayor con 26,72 gr comparado con la media de las restantes localidades (Copiapó, San Pedro de Atacama, Calama, Pachica y Azapa). El cuanto a los frutos del valle de Copiapó, estos poseen significativamente el peso más pequeño (3,04 gr) comparado con los frutos de cuatro localidades (San Pedro de Atacama, Alto del Carmen, Pachica y Azapa), pero, es significativamente similar al peso de los frutos Calama.

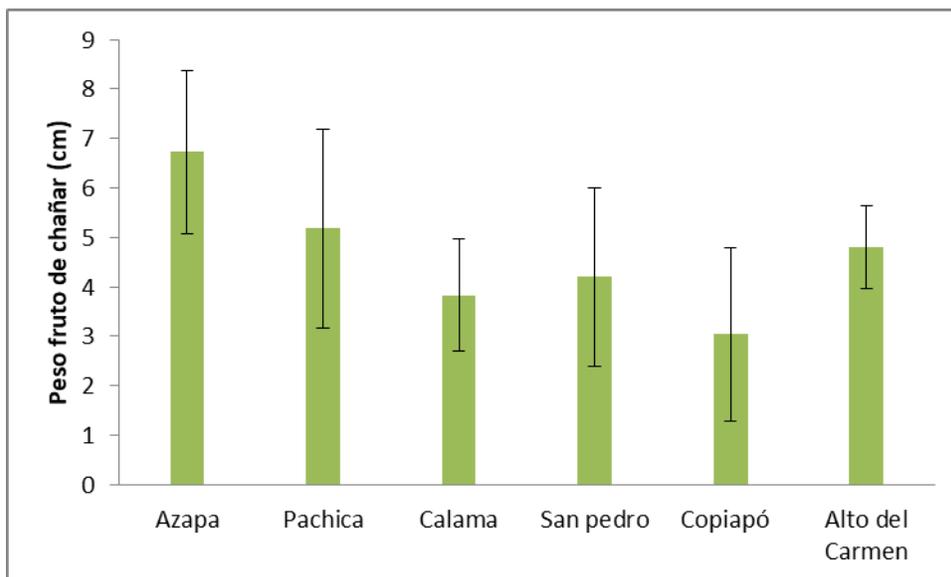


Figura 5: Promedio de peso de frutos de chañar de seis localidades. Las barras muestran en la parte superior una línea representando la desviación estándar (DS±).

Tabla 7: ANOVA y Prueba de Tukey de datos obtenidos del peso de fruto de chañar de seis localidades.

| <i>F.V.</i> | <i>S.C.</i> | <i>g.l.</i> | <i>M.C.</i> | <i>F</i> | <i>Sig.</i> |
|----------------------|-------------|-------------|-------------|----------|-------------|
| Entre grupos | 512,6254 | 5 | 102,5250 | 38,46 | 3,91E-32 |
| Dentro de los grupos | 1050,1853 | 394 | 2,6654 | | |
| Total | 77,6917 | 399 | | | |

Prueba de Tukey

| | Azapa | Pachica | Calama | San Pedro | Copiapó | AC |
|-----------|-------|----------|-----------|-----------|----------|----------|
| Azapa | | 2,29E-05 | 2,03E-05 | 2,03E-05 | 2,03E-05 | 2,03E-05 |
| Pachica | 7,352 | | 0,0001104 | 0,01343 | 2,03E-05 | 0,822 |
| Calama | 13,73 | 6,379 | | 0,8201 | 0,08793 | 0,01327 |
| San Pedro | 11,99 | 4,634 | 1,746 | | 0,001505 | 0,3161 |
| Copiapó | 17,46 | 10,11 | 3,733 | 5,478 | | 2,04E-05 |
| AC | 9,092 | 1,74 | 4,639 | 2,894 | 8,372 | |

4.2.-Características ambientales del Valle de Azapa-LLuta, Valle de Copiapó y Valle de Huasco

Tabla 8: Calidad química del agua de riego en el Valle de Azapa-LLuta, Valle de Copiapó y Valle de Huasco

| Análisis | Valle de Azapa | Valle de LLuta (zona baja) | Valle de Copiapó | | Valle de Huasco | |
|------------------------------------|--------------------------|----------------------------|-----------------------------------|-------------------------------|-----------------|------------|
| | | | Min | Max | Min | Max |
| pH | 7,96 | 8,16 | 6,4(**) 8,04 (*) | 9,0(**) 8,22 (*) | 6,6 | 9,8 |
| CE (dS m ⁻¹) | 1,83 | 5,5 | 0,114(**) | 6,58(**) | 0,372 | 4,61 |
| Calcio | 9,45 meq L ⁻¹ | 20,24 meq L ⁻¹ | 3,4 mmol/L (*) | 7,84 mmol/L (*) | s/i | s/i |
| Magnesio | 1,88 meq L ⁻¹ | 8,46 meq L ⁻¹ | 0,83 mmol/L (*) | 2,37 mmol/L (*) | s/i | s/i |
| Sodio | 4,09 meq L ⁻¹ | 22,17 meq L ⁻¹ | 1 mmol/L (*) | 4,31 mmol/L (*) | s/i | s/i |
| Potasio (meq L ⁻¹) | 0,14 meq L ⁻¹ | 2,56 meq L ⁻¹ | | | s/i | s/i |
| Bicarbonato (meq L ⁻¹) | 1,67 meq L ⁻¹ | 1,57 meq L ⁻¹ | 2,2 mmol/L (*) | 3,1 mmol/L (*) | s/i | s/i |
| Cloruro (meq L ⁻¹) | 9,35 meq L ⁻¹ | 31,13 meq L ⁻¹ | 6,0(**) | 805(**) | 1,8 mg/L | 824,2 mg/L |
| Sulfato (meq L ⁻¹) | 5,73 meq L ⁻¹ | 21,3 meq L ⁻¹ | 24(**) | 2822(**) | 50 mg/L | 1161 mg/L |
| Boro | 1,03 ppm | 16 ppm | <1(**) | 7(**) | <1 mg/L | 4 mg/L |
| RAS | s/i | 5,85 | 0,16 (*) 0,1 (**) 0,67 (*) | 1,3 (*) 9,4(**) 2,5 (*) | 0,2 | 7,2 |
| Na (%) | s/i | 41,65 | s/i | s/i | s/i | s/i |
| Referencias | Torres y Acevedo (2008) | Torres y Acevedo (2008) | DGA (2004)b (**) INIA 2001 (*) | | DGA (2004)a | |

s/i = Sin información

Tabla 9: Temperatura y Humedad Relativa ambiental en el Valle de Azapa, Valle de Copiapó y Valle de Huasco

| | Valle de Azapa | Valle de Copiapó | Valle del Huasco | | |
|-------------------------|----------------|------------------|------------------|----------|-------------------|
| | | | San Felix | Vallenar | Huasco |
| T° máx media anual (°C) | 23,6 | 24,4 | 26 | 22,9 | 18,3 |
| T° min media anual (°C) | 14,1 | 8,9 | 6 | 9,1 | 11,3 |
| Media anual (°C) | 18,8 | 16,6 | 16 | 14,5 | 14,8 |
| Máx media enero (°C) | 28,2 | 28,7 | 33 | 26,5 | 22,7 |
| Mín media julio (°C) | 11,3 | 5 | 2 | 5,7 | 8,8 |
| HR Enero (%) | 62,9 | 68,7 | 55 | 68 | 80,9 ¹ |
| HR julio (%) | 73,3 | 74,6 | 41 | 68 | 82,5 ¹ |
| HR media (%) | 67,9 | 71,65 | 47 | 69 | 81,7 ¹ |
| Referencias | Tapia (2003) | | INIA(a) | | |

¹Freirina

s/i = Sin información



Tabla 10: Calidad química del suelo en el Valle de Azapa-LLuta, Valle de Copiapó y Valle de Huasco

| Análisis | Valle de Azapa | Valle de LLuta (Zona baja) | Valle de Copiapó | Valle del Huasco |
|--------------------------|------------------------------|--|------------------|--|
| pH | 8,62 | Fuertemente ácido a moderadamente alcalino | 7,9-8,4 | 8,4 |
| CE (dS m ⁻¹) | 2,97 | 4,5 a 99,8 | 4 a 19,1 | 5,5-7,3 |
| PSI | s/i | 6 a 56% | 5,9 a 20% | |
| RAS | s/i | | 5,2 a 20,1 | 8,7 a 10,6 |
| Boro | s/i | 10 ppm | 1,3 a 27,1 mg/L | 2,91 a 4,1 mg/kg |
| Cloruros | s/i | 20,4 a 1086,4 meq L ⁻¹ | 4,4 a 140 mmol/L | 21,7 a 30,7 meq/L |
| Sulfatos | s/i | 40,5 a 270 meq L ⁻¹ | 0,5 a 102 mmol/L | 0,4 a 0,5 meq/L |
| M.O. (%) | 3,21 | 2 a 4,9 | s/i | 1,3 a 1,8 |
| Referencias | Salinas-Vásquez et al (2014) | Torres y Acevedo (2008) | INIA (2001) | Prodesal-INDAP: Fundo Olivos Centenarios |

s/i = Sin información

4.3.-Evaluación de métodos de extracción de ADN

La búsqueda de un método de extracción de ADN para hojas y alimentos a base de chañar, fue motivado por el hecho de que se obtienen resultados ambiguos en las PCRs dirigidos a los marcadores moleculares RAPD e ISSR en distintas muestras de Chañar (ver Figura 21). En particular, los patrones de bandas de amplificación de PCR de estas muestras no fueron reproducibles, especialmente de muestras de Chañar procedentes de regiones con alto contenido de sal y bajo estrés hídrico, como es el caso del desierto de Atacama. Al final, los resultados obtenidos impidieron el uso de análisis genéticos, debido a una mala extracción de ADN. Por lo tanto, fue necesario buscar un método que permitiera la extracción de ADN de baja calidad y contaminación de cualquier material de partida, independientemente del lugar de origen de la muestra.

El primer paso para evaluar los métodos de extracción fue medir las cantidades de ADN obtenidas por espectrofotometría. Además de la concentración de ADN, la calidad y la limpieza de las muestras se cuantificaron utilizando las relaciones de absorbancia de 260/280 y 260/230 nm, respectivamente (Tabla 11). Así también, la Tabla 11 también muestra las mediciones promedio del material de partida a partir de tres réplicas para cada uno de los métodos probados. Estas mediciones muestran que no hay diferencias relevantes entre ellas como se esperaba, excepto para el método CTAB-Fenol-Columna. Este método muestra el menor valor promedio de contaminantes, 260/230 = 2,663 (± 0,326), a diferencia de los otros métodos que muestran valores inferiores a 1.523 (± 0.232).



El segundo paso de la evaluación comprendió la estimación de la integridad del ADN extraído mediante electroforesis en gel de agarosa (datos no mostrados). El ADN extraído por el método CTAB-Fenol-Columna permite la amplificación de patrones ISSR y RAPD que son reproducibles con todos los cebadores analizados (Figura 18, 19, 20 y 22).

Finalmente, como muestra la Tabla 12, dos muestras por método fueron seleccionadas al azar y probadas para observar la cantidad de proteína presente en ellas. En algunos casos, no hubo un valor numérico asociado con una muestra, ya que la concentración de proteína en ellos está por debajo del límite de detección del instrumento utilizado para realizar la medición (por debajo de 1 ug / ml). Esto se observa en los dos últimos métodos. Sin embargo, el método CTAB-Fenol-Columna en particular muestra la menor cantidad de contaminantes proteicos, que está en concordancia con los valores mostrados en la Tabla 11, confirmando que el método produce la menor cantidad de contaminación.

La extracción de ADN del arropo y harina de Chañar con los métodos tres primeros métodos mostró bajos niveles de calidad (relación 260/280) y limpieza (relación 260/230) (Tabla 13). Estos tres métodos mostraron valores de calidad de ADN menor 0,825 y de limpieza inferior a 0,66, lo que refleja la baja calidad y los altos niveles de contaminación del ADN. Sin embargo, tanto para arropo y harina de chañar, el método CTAB-Fenol-Columna mostró valores de calidad y limpieza más altos, con un rendimiento más aceptable que los otros tres métodos (Tabla 13).

El desarrollo de métodos moleculares ha llevado a la necesidad de protocolos de extracción de ADN más simples y eficientes. Sin embargo, las variaciones en la eficacia de la lisis, el rendimiento y la integridad del ADN pueden afectar los resultados de técnicas moleculares tales como PCR, hibridación y clonación. Los métodos basados en marcadores moleculares, como ISSR y RAPD, requieren un método de extracción de ADN tan estandarizado como sea posible, para obtener un producto puro, no degradado, libre de ARN y de inhibidores de la PCR, y por lo tanto, que muestren patrones reproducibles.

Actualmente, existen múltiples protocolos eficientes para la extracción y purificación de ADN en plantas. A pesar de este hecho, el aislamiento del ADN de la planta generalmente se ve comprometido por la excesiva contaminación de metabolitos secundarios, por lo que cada método debe ajustarse a cada especie de planta e incluso a cada tejido vegetal dada la presencia de estos metabolitos.

El Chañar habita en lugares semidesérticos, permanentemente expuestos a condiciones de estrés. Las plantas, para sobrevivir a estas condiciones, sintetizan altas cantidades de polisacáridos, polifenoles y otros metabolitos secundarios como alcaloides y flavonoides, algunos de los cuales son indispensables para la actividad fisiológica de las plantas (Popovic et al., 2016; Krasensky y Jonak, 2012). Lamentablemente, estos compuestos evitan el aislamiento del ADN (Sahu et al., 2012).



El método que mostró más ventajas fue el CTAB-Fenol-Columna, dado que tiene valores de rendimiento aceptables en ng / μ L y un valor óptimo del parámetro 260/280. Además, es el método con los mejores resultados en los análisis ISSR y RAPD (Figura 18, 19, 20 y 22).

Con respecto a la dificultad de cada método, éste aumenta según la etapa de extracción. Los primeros dos métodos se vuelven problemáticos después de la adición de cloroformo / alcohol isoamílico, ya que es difícil recuperar el sobrenadante. En particular, las fases inferiores de la solución pierden estabilidad rápidamente después de la inserción de la pipeta, y se mueven hacia arriba de la solución. Esto ralentiza la extracción dado que solo se necesita recuperar el sobrenadante para mantener la preparación libre de contaminantes. Además, en la etapa en que se agrega isopropanol, hay una formación casi instantánea de una masa marrón y altamente viscosa. Esto se mezcla con el ADN precipitado en las siguientes etapas del método CTAB-Pellet, lo que da como resultado un extracto final altamente viscoso que también está pigmentado y es difícil de manipular. En el Método CTAB-columna, se puede evitar esta masa, ya que puede descartarse cuando se transfiere el líquido a la mini columna. Por lo tanto, el resultado final es un extracto más factible para la manipulación, aunque todavía tan contaminado como el Método CTAB-Pellet y ligeramente pigmentado.

Como fue el caso con los resultados de buena extracción de ADN de hojas de Chañar con el último método, éste método también resultó efectivo en la extracción de ADN de Chañar arropo y harina (Tabla 13), permitiendo la amplificación exitosa de ADN. Para la amplificación por PCR de productos arropo, se utilizaron cebadores más cortos (<100 pb), ya que hay informes (Scarano y Rao, 2014) que señalan que la fragmentación del ADN es un problema común en productos alimenticios procesados a altas temperaturas y larga vida útil. En el caso de arropo, fue sorprendente obtener ADN de calidad, dadas las más de cuatro horas de ebullición continua. Esto también sugiere una posible razón para la incapacidad de obtener un producto de PCR de Chañar arropo usando cebadores dirigidos a microsatélites SSR-F119 (ver Figura 28), ya que el fragmento esperado es mayor que 155 pb, que está por encima de los límites de detección para productos tratados a alta temperatura. Debe señalarse que solo las extracciones de ADN de arropo con valores de calidad y limpieza superiores a 1,6 y 1,2, respectivamente, permitieron la amplificación exitosa de fragmentos de PCR de los genes *GdtrnL* y *GdmatK*.

Existen varios métodos de extracción de ADN utilizados en el análisis de productos alimenticios (Scarano y Rao, 2014), pero la mayoría de ellos están limitados principalmente por la presencia de inhibidores en la extracción. Efectivamente, la amplificación exitosa de productos de PCR a partir de harina de Chañar, arropo e incluso hojas no fue fácil, dado que el tejido de Chañar contiene grandes concentraciones de polifenoles y polisacáridos, ambas familias de compuestos que se sabe son inhibidores de PCR. La información de un producto alimenticio es esencial para que los consumidores puedan elegir un producto alimenticio sobre otro, por esta razón, la identificación directa del polimorfismo del ADN permite autenticar los alimentos procesados y evitar los fraudes alimentarios (Scarano y Rao, 2014).



Tabla 11: Comparación de tiempo de procesamiento, concentración, calidad y contaminación de ADN de hoja de *G. decorticans* de distintas localidades con distinto método de extracción.

| Método de extracción de ADN | Muestra | Tiempo (Hrs) | Material de partida (gr) | Concentración de ADN ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) | Calidad 260/280 | Limpieza 260/230 |
|-----------------------------|----------|--------------|--------------------------|--|-----------------------|-----------------------|
| CTAB-Pellet | Azapa | | 0.11 (± 0.010) | 668.3 (± 135.9) | 1.882 (± 0.038) | 1.254 (± 0.061) |
| | Chaca | | 0.11 (± 0.015) | 563.6 (± 257.6) | 1.844 (± 0.069) | 1.122 (± 0.115) |
| | Pachica | | 0.11 (± 0.012) | 627.6 (± 120.9) | 1.930 (± 0.035) | 1.277 (± 0.067) |
| | S. Pedro | | 0.10 (± 0.000) | 481.2 (± 77.71) | 1.786 (± 0.094) | 0.955 (± 0.108) |
| | Copiapó | | 0.12 (± 0.006) | 1824 (± 787.8) | 1.933 (± 0.014) | 1.535 (± 0.123) |
| | Totoral | | 0.11 (± 0.010) | 580.2 (± 134.5) | 1.873 (± 0.061) | 1.084 (± 0.128) |
| Promedio | | 24 h | 0.109 (± 0.009) | 790.8 (± 252.4) | 1.875 (± 0.052) | 1.204 (± 0.200) |
| CTAB-Columna | Azapa | | 0.11 (± 0.000) | 500.8 (± 180.8) | 1.925 (± 0.113) | 1.424 (± 0.272) |
| | Chaca | | 0.12 (± 0.012) | 223.2 (± 84.95) | 1.853 (± 0.052) | 1.398 (± 0.148) |
| | Pachica | | 0.11 (± 0.006) | 166.8 (± 48.11) | 1.886 (± 0.010) | 1.460 (± 0.174) |
| | S. Pedro | | 0.11 (± 0.010) | 600.3 (± 478.9) | 1.965 (± 0.042) | 1.494 (± 0.290) |
| | Copiapó | | 0.11 (± 0.006) | 549.1 (± 239.3) | 1.936 (± 0.090) | 1.505 (± 0.395) |
| | Totoral | | 0.11 (± 0.006) | 219.4 (± 11.38) | 2.002 (± 0.001) | 1.860 (± 0.116) |
| Promedio | | 4 h | 0.11 (± 0.006) | 376.6 (± 173.9) | 1.928 (± 0.051) | 1.523 (± 0.232) |
| Kit comercial | Azapa* | | 0.10 (± 0.006) | 480.9 (± 134.2) | 1.348 (± 0.025) | 0.550 (± 0.027) |
| | Chaca | | 0.12 (± 0.006) | 15.4 (± 1.841) | 1.825 (± 0.169) | 1.162 (± 0.092) |
| | Pachica | | 0.11 (± 0.012) | 37.2 (± 11.83) | 1.275 (± 0.204) | 0.423 (± 0.198) |
| | S. Pedro | | 0.11 (± 0.006) | 3.8 (± 0.689) | 1.675 (± 0.051) | 0.811 (± 0.199) |
| | Copiapó | | 0.10 (± 0.006) | 23.0 (± 1.982) | 1.777 (± 0.030) | 1.399 (± 0.195) |
| | Totoral* | | 0.11 (± 0.006) | 4.3 (± 1.489) | 1.921 (± 0.137) | 0.186 (± 0.180) |
| Promedio | | 2 h | 0.108 (± 0.007) | 19.9 (± 4.090) | 1.638 (± 0.114) | 0.949 (± 0.171) |
| CTAB-Fenol-Columna | Azapa | | 0.10 (± 0.006) | 51.10 (± 5.105) | 1.880 (± 0.080) | 3.143 (± 0.702) |
| | Chaca | | 0.12 (± 0.010) | 62.20 (± 13.50) | 1.915 (± 0.055) | 2.829 (± 0.109) |
| | Pachica | | 0.11 (± 0.012) | 177.7 (± 83.80) | 2.006 (± 0.033) | 2.434 (± 0.392) |
| | S. Pedro | | 0.11 (± 0.006) | 302.7 (± 24.26) | 2.147 (± 0.020) | 2.462 (± 0.197) |
| | Copiapó | | 0.11 (± 0.006) | 639.2 (± 111.0) | 2.113 (± 0.013) | 2.187 (± 0.035) |
| | Totoral | | 0.11 (± 0.006) | 132.6 (± 45.56) | 2.023 (± 0.034) | 2.923 (± 0.523) |
| Promedio | | 5 h | 0.109 (± 0.007) | 227.6 (± 221.4) | 2.014 (± 0.039) | 2.663 (± 0.326) |



Tabla 12: Concentración de proteína de dos muestras de cada método de extracción de ADN.

| Samples | Protein concentration (ug/mL) | | | |
|---------|-------------------------------|---------------------|---------------------------|---------------------------|
| | CTAB-Pellet | CTAB-Columna | Kit comercial | CTAB-Fenol-Columna |
| Azapa | 1.8 (± 0.53) | 2.92 (± 0.13) | 10.5 (± 0.35) | < 1 (detection range out) |
| Totoral | 5.35 (± 0.86) | 2.26 (± 0.24) | < 1 (detection range out) | < 1 (detection range out) |

Tabla 13: Comparación de tiempo de procesamiento, concentración, calidad y contaminación de ADN de alimentos a base de *G. decorticans* con distinto método de extracción.

| DNA extraction method | Sample | Time (H) | Starting material | DNA concentration ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) | Quality 260/280 | Cleanliness 260/230 |
|-----------------------|--------|----------|-------------------|---|-----------------------|-----------------------|
| CTAB-Pellet | flour | 24 | 0.10 g | 67.688 (± 34.6) | 1.375 (± 0.205) | 0.375 (± 0.049) |
| | arropo | 24 | 250 μL | 61.53 (± 48.32) | 0.817 (± 0.016) | 0.175 (± 0.049) |
| CTAB-Columna | flour | 4 | 0.10 g | 28.82 (± 14.67) | 1.28 (± 0.311) | 1.1 (± 0.424) |
| | arropo | 6 | 250 μL | 5.59 (± 4.73) | 0.825 (± 0.007) | 0.305 (± 0.205) |
| Kit comercial | flour | 2 | 0.10 g | 5.42 (± 0.091) | 1.17 (± 0.014) | 0.61 (± 0.003) |
| | arropo | 2 | 250 μL | 3.22 (± 0.458) | 0.825 (± 0.069) | 0.66 (± 0.551) |
| CTAB-Fenol-Columna | flour | 5 | 0.10 g | 120.36 (± 15.65) | 1.79 (± 0.035) | 1.28 (± 0.106) |
| | arropo | 7 | 250 μL | 19.26 (± 16.602) | 1.63 (± 0.084) | 1.08 (± 0.318) |

4.4.-Evaluación de marcadores moleculares de ADN en olivo

4.4.1.-Análisis de perfil genético con marcadores ISSR y RAPD de 458 muestras de Sevillana del Huasco y variedades de olivos del resto de Chile.

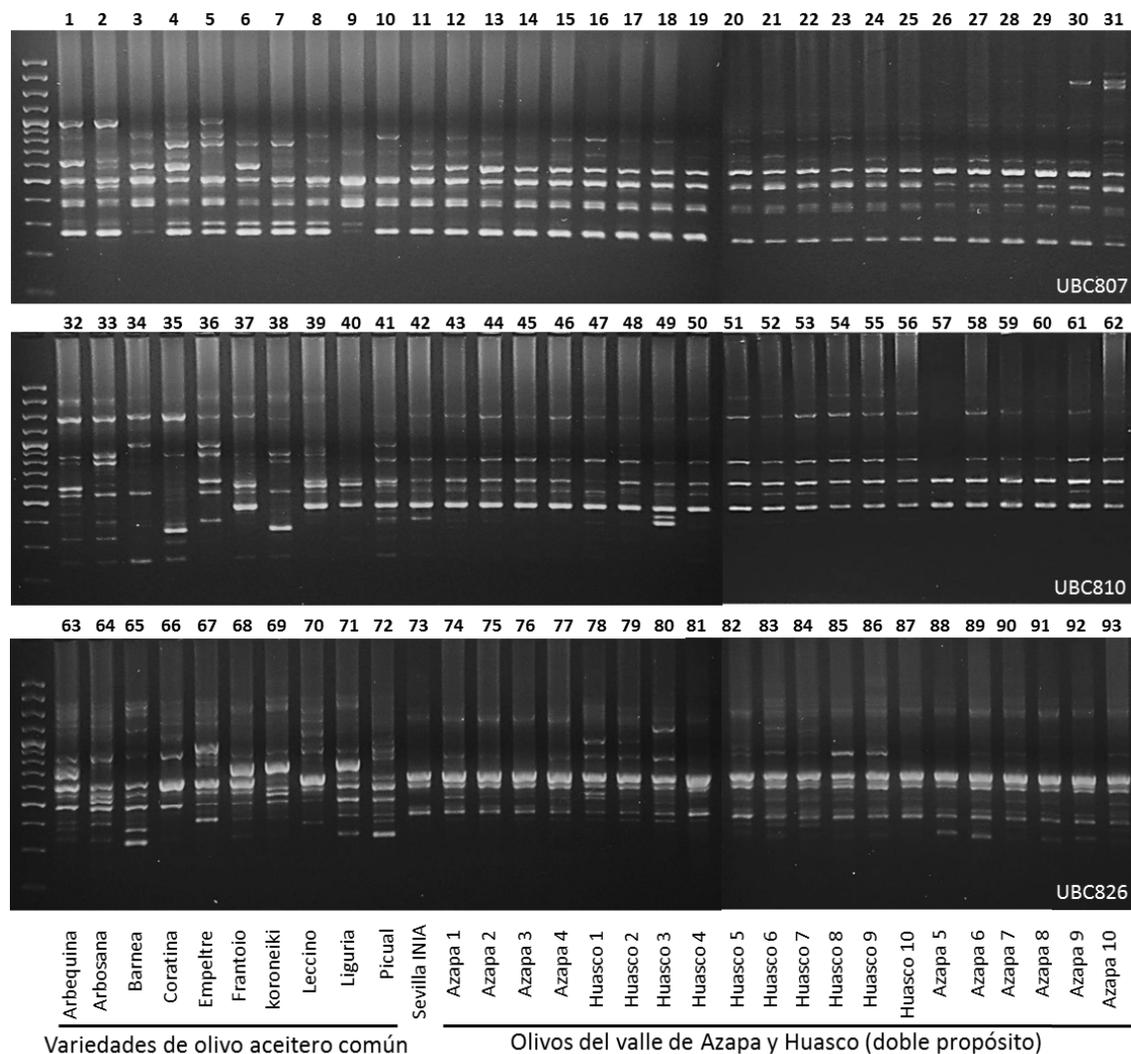


Figura 6: Perfil genético de individuos de olivo con marcadores ISSR, análisis desde N°1 hasta el N°93.

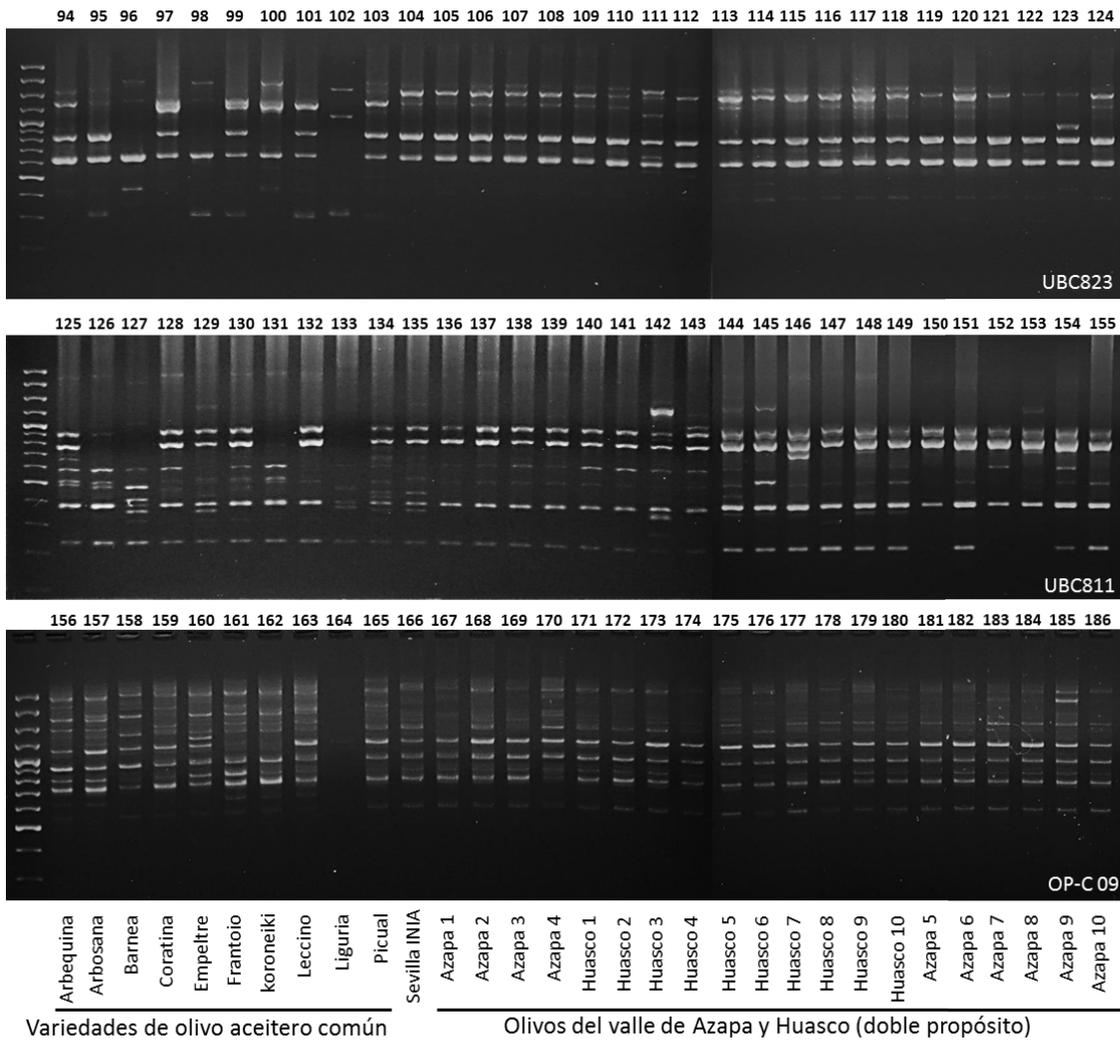


Figura 7: Perfil genético de individuos de olivo con marcadores ISSR y RAPD, análisis desde N°94 hasta el N°186.

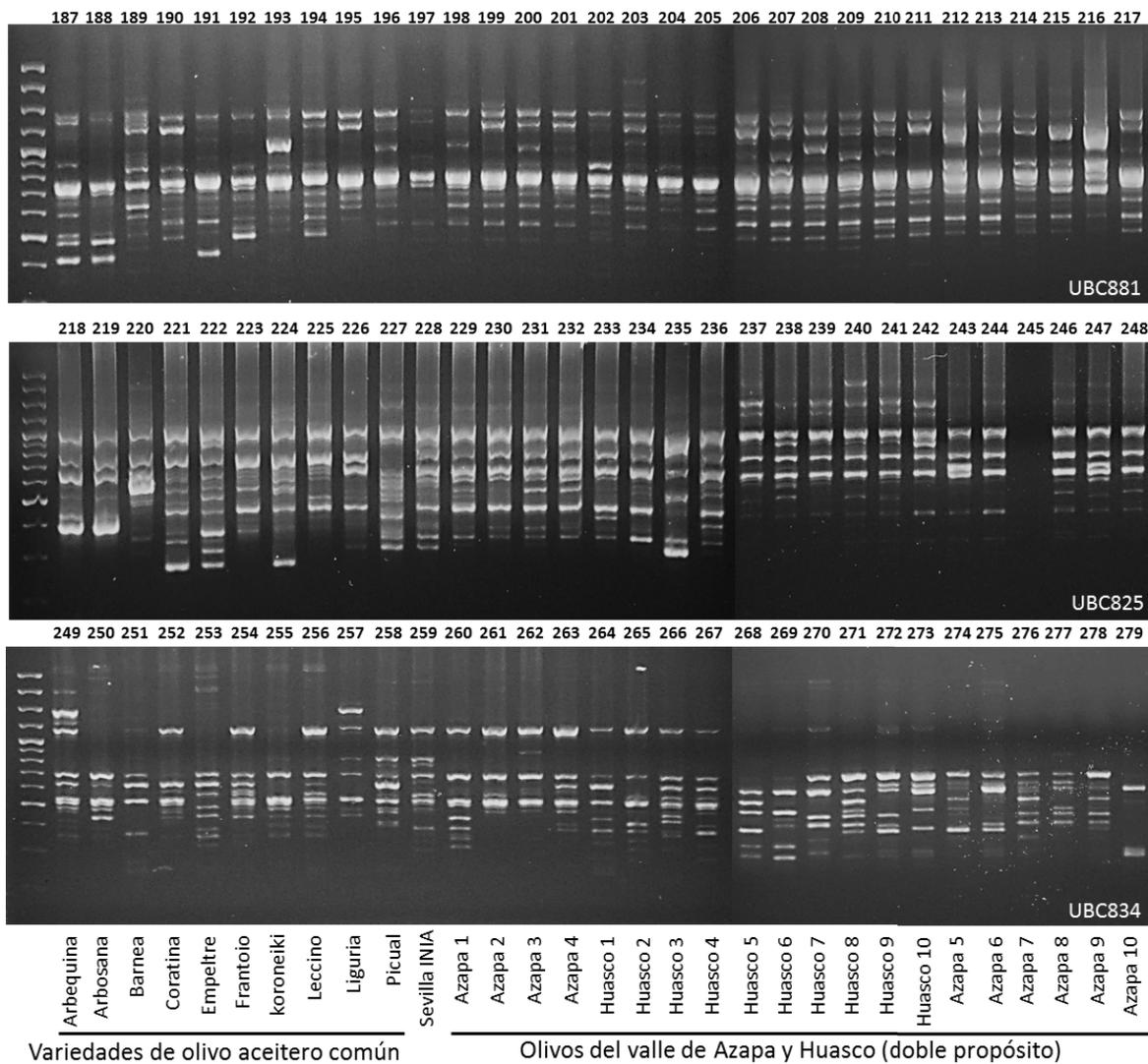


Figura 8: Perfil genético de individuos de olivo con marcadores ISSR, análisis desde N°187 hasta el N°279.

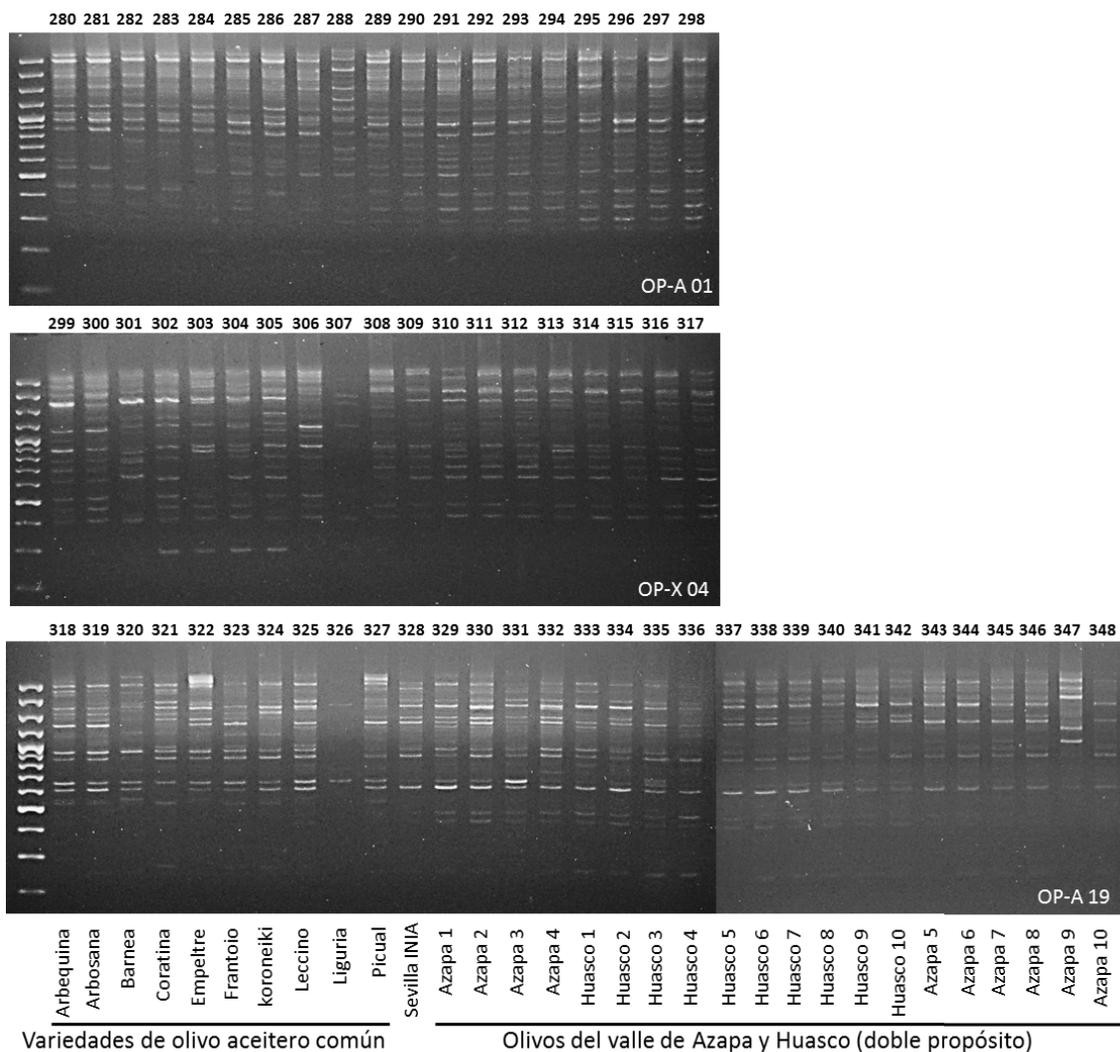


Figura 9: Perfil genético de individuos de olivo con marcadores RAPD, análisis desde N°280 hasta el N°348.

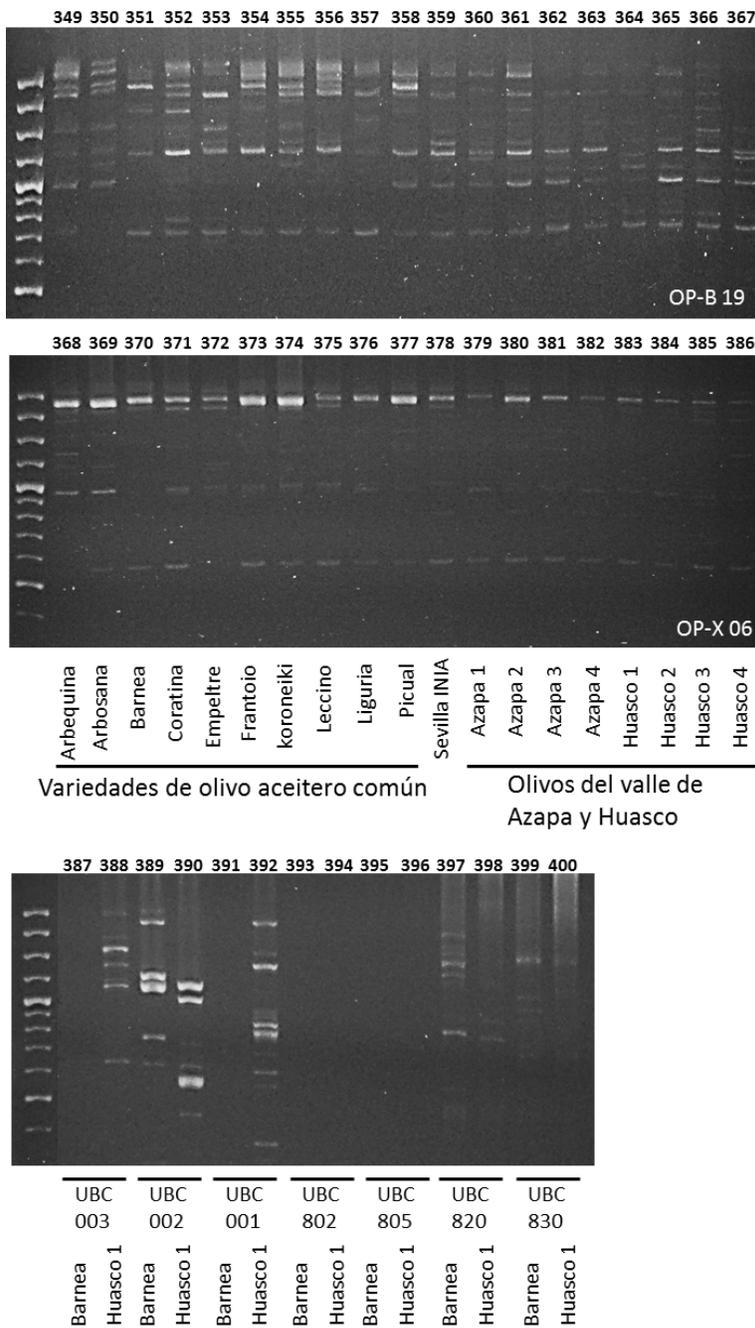


Figura 10: Perfil genético de individuos de olivo con marcadores ISSR y RAPD, análisis desde N°349 hasta el N°400.

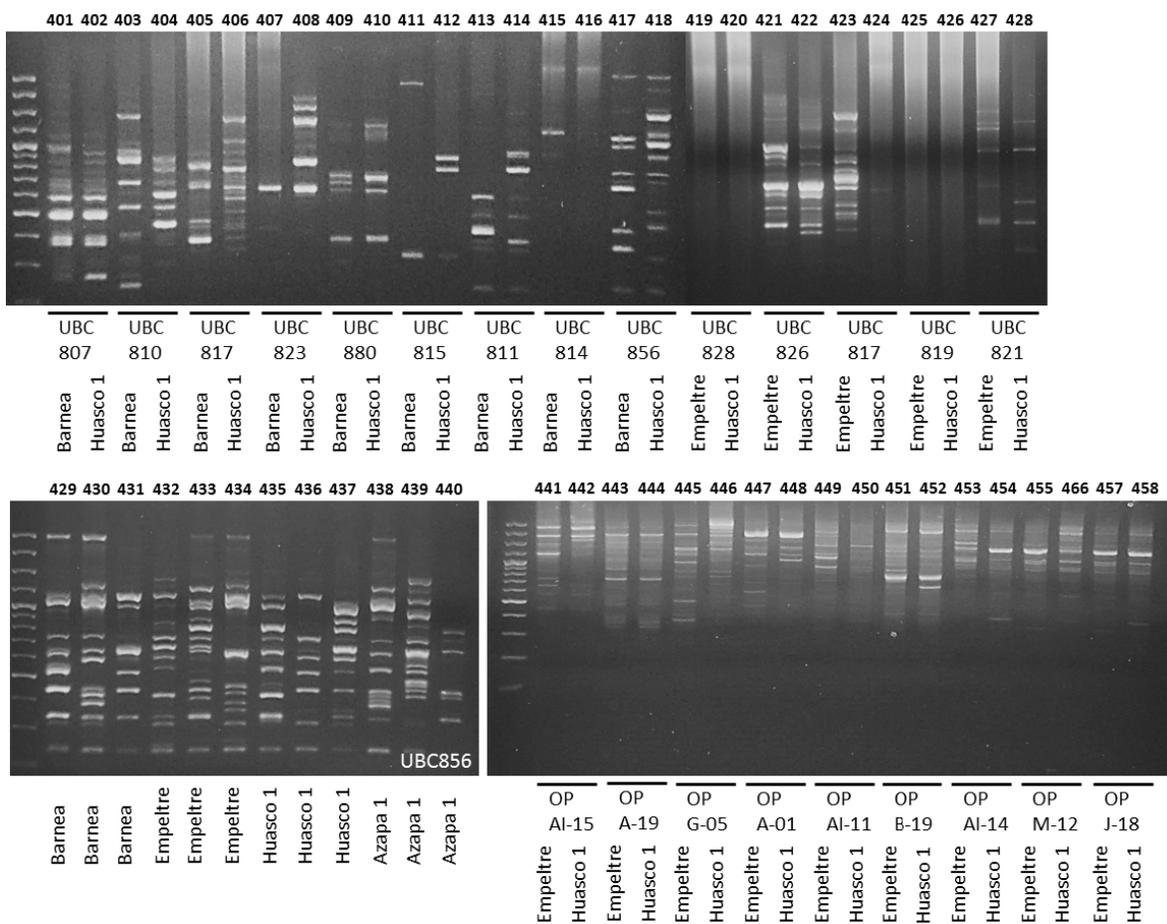


Figura 11: Perfil genético de individuos de olivo con marcadores ISSR y RAPD, análisis desde N°401 hasta el N°458.

4.4.2.-Análisis de perfil genético de 40 muestras de aceite de oliva con marcador SSR.

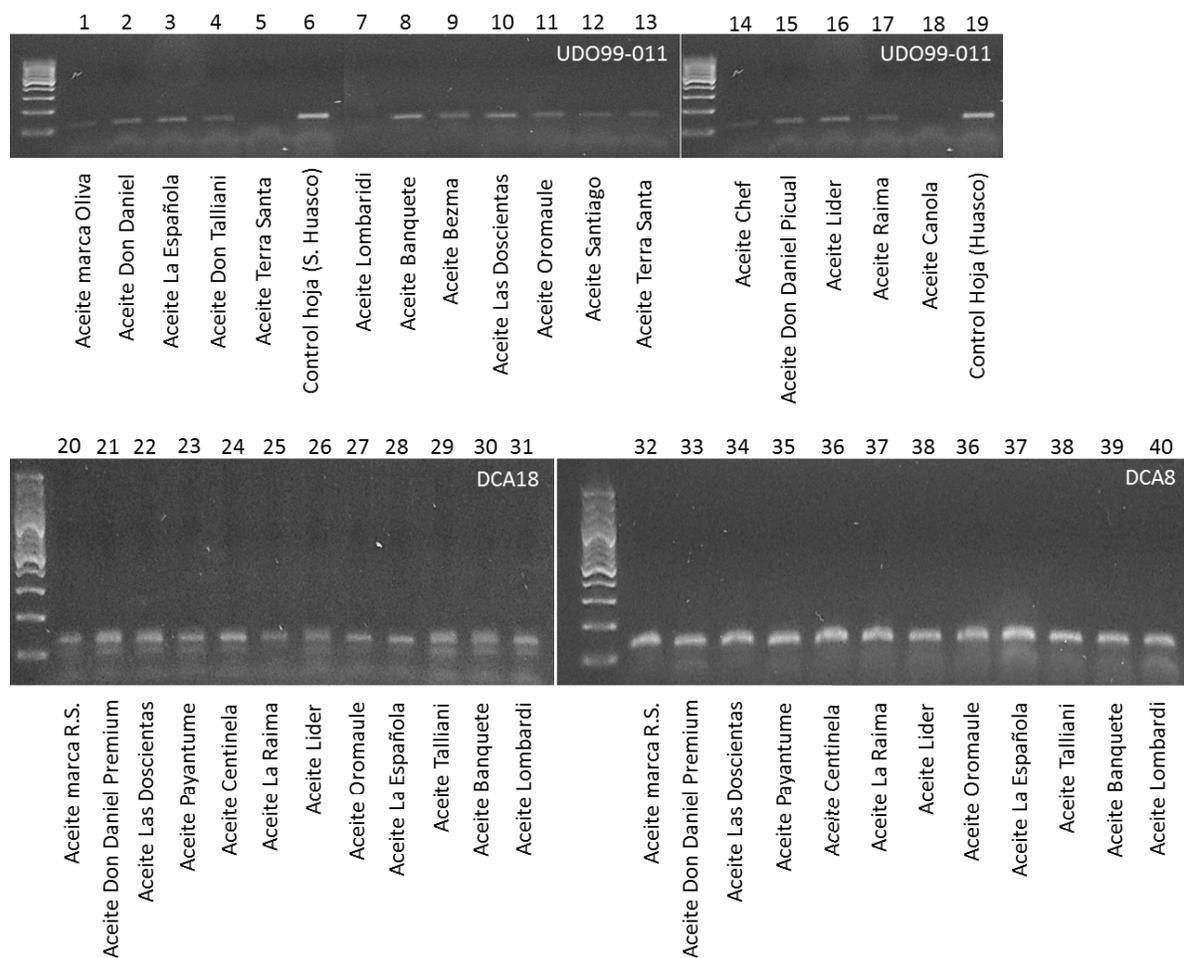


Figura 12: Perfil genético de aceites de oliva con marcador SSR, análisis desde N°1 hasta el N°40.

El Análisis de perfil genético con marcador SSR de 216 muestras de Sevillana del Huasco y variedades de olivos del resto de Chile y el análisis de perfil genético de 64 variedades de oliva con marcador SSR se pueden observar en el ANEXO 3.

4.5.-Evaluación de marcadores moleculares de ADN en chañar

4.5.1.-Análisis de perfil genético con marcador ISSR y RAPD de 466 muestras de ADN chañar de Copiapó y chañares del resto de Chile.

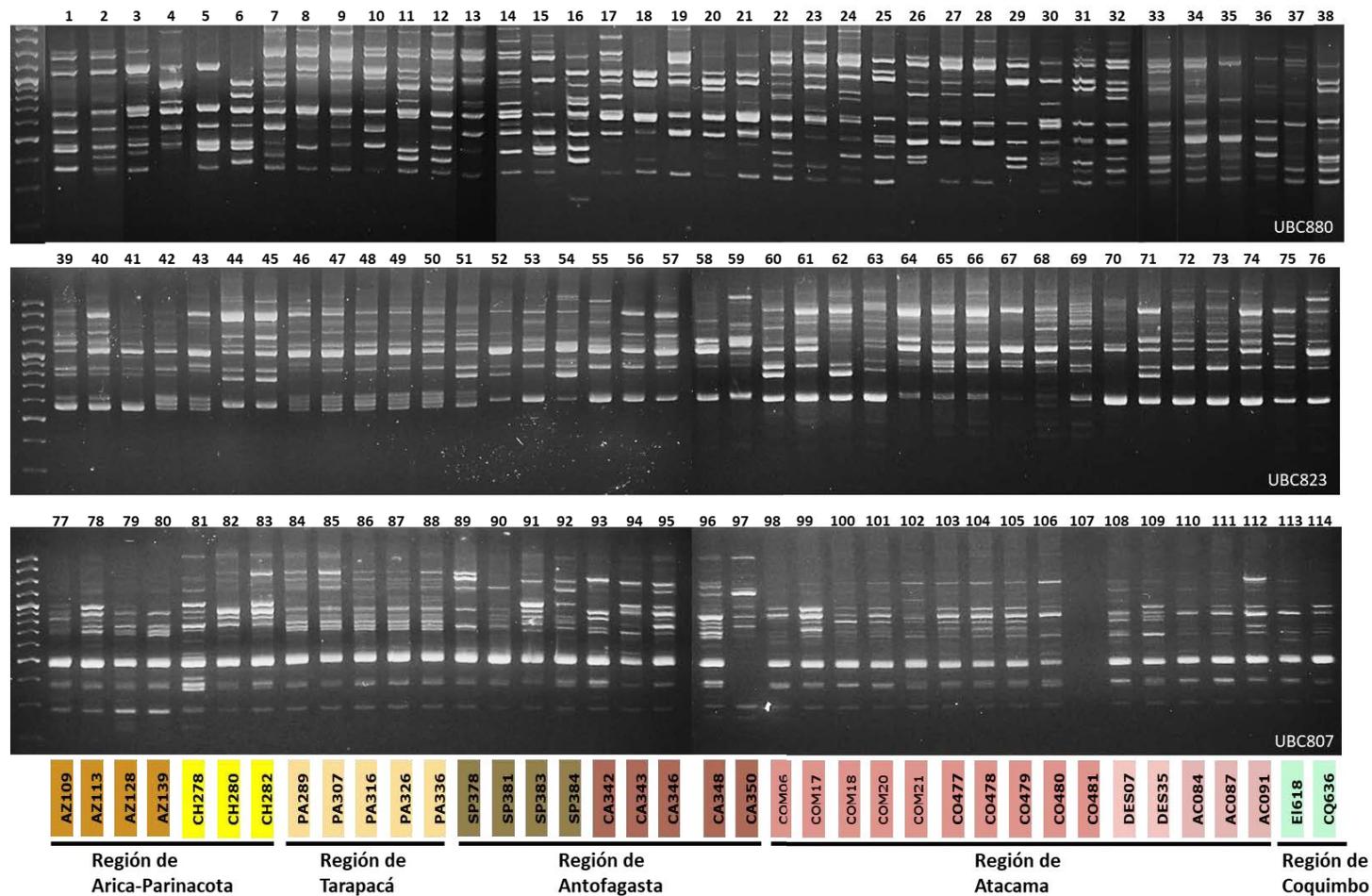


Figura 13: Perfil genético de individuos de chañar con marcadores ISSR, análisis desde N°1 hasta el N°114.

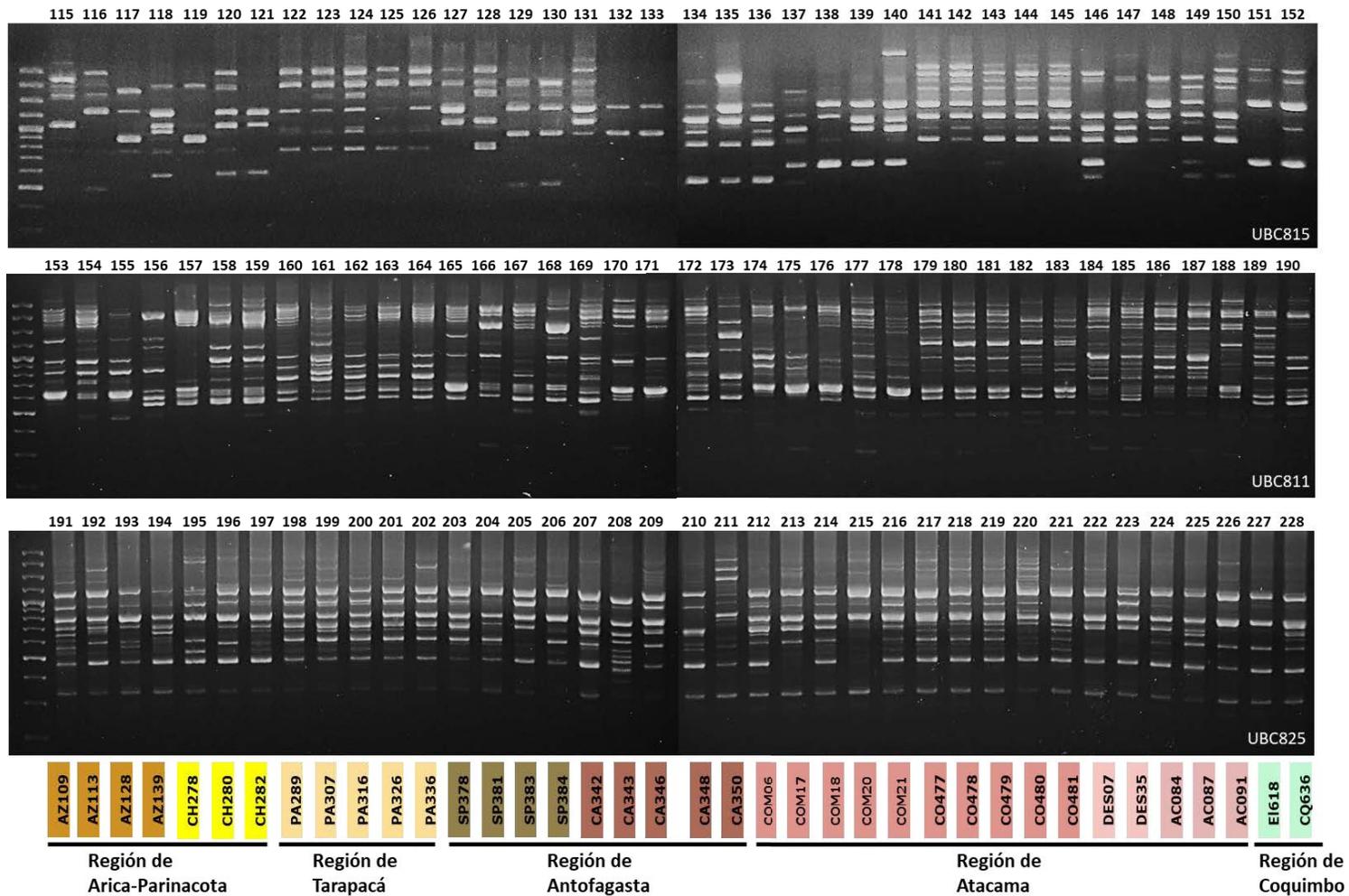


Figura 14: Perfil genético de individuos de chañar con marcador ISSR, análisis desde N°115 hasta el N°228.

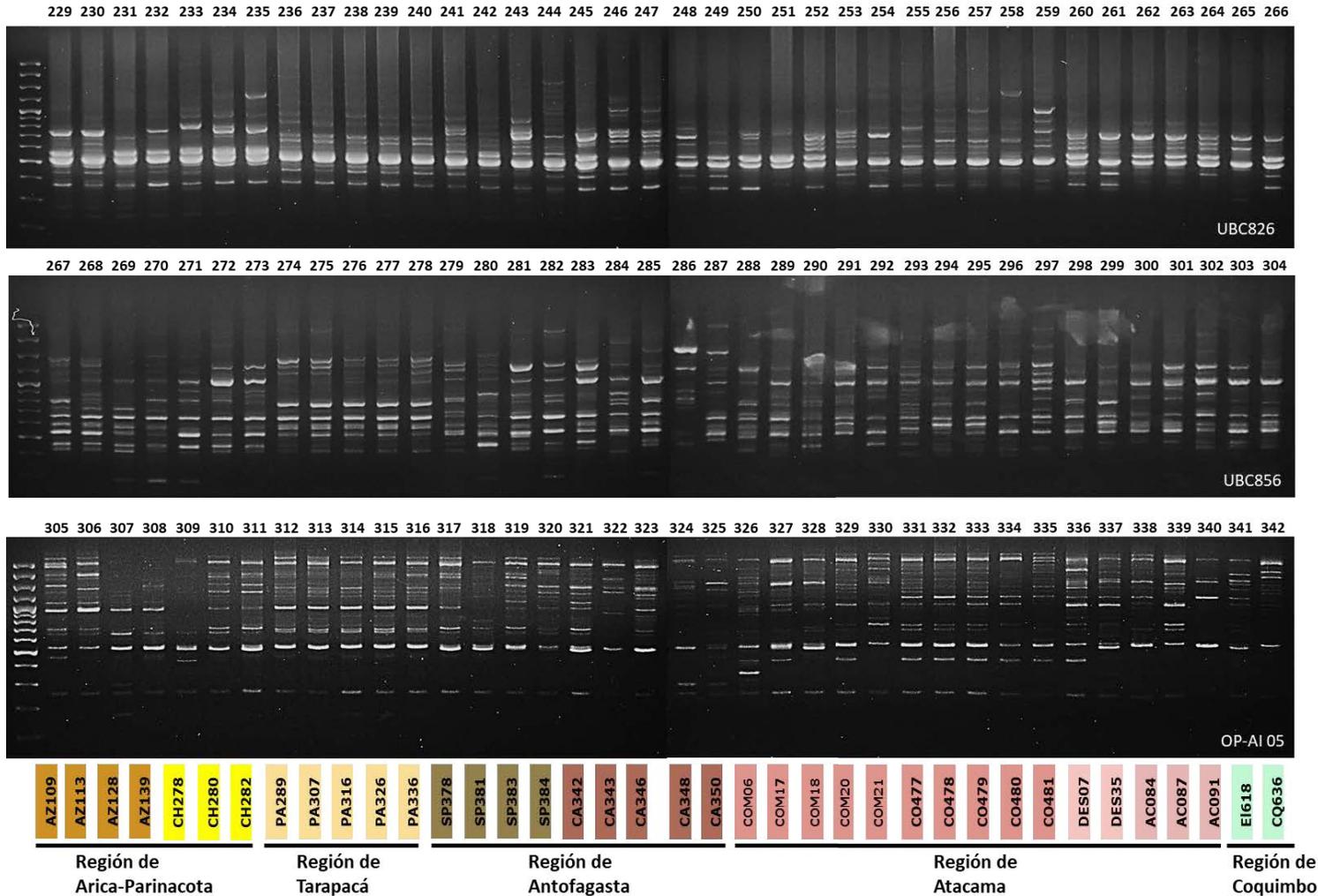


Figura 15: Perfil genético de individuos de chañar con marcador ISSR y RAPD, análisis desde N°229 hasta el N°342.

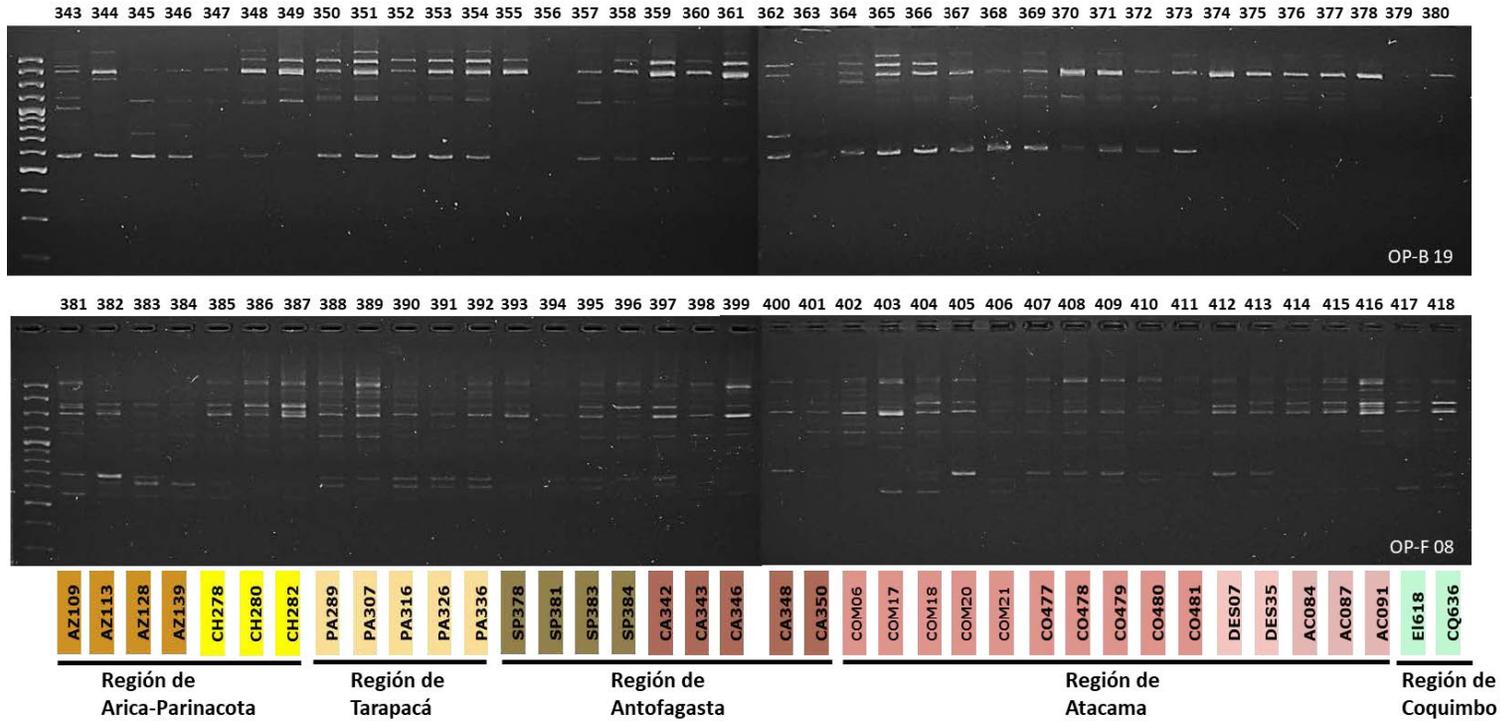


Figura 16: Perfil genético de individuos de chañar con marcador RAPD, análisis desde N°343 hasta el N°418.

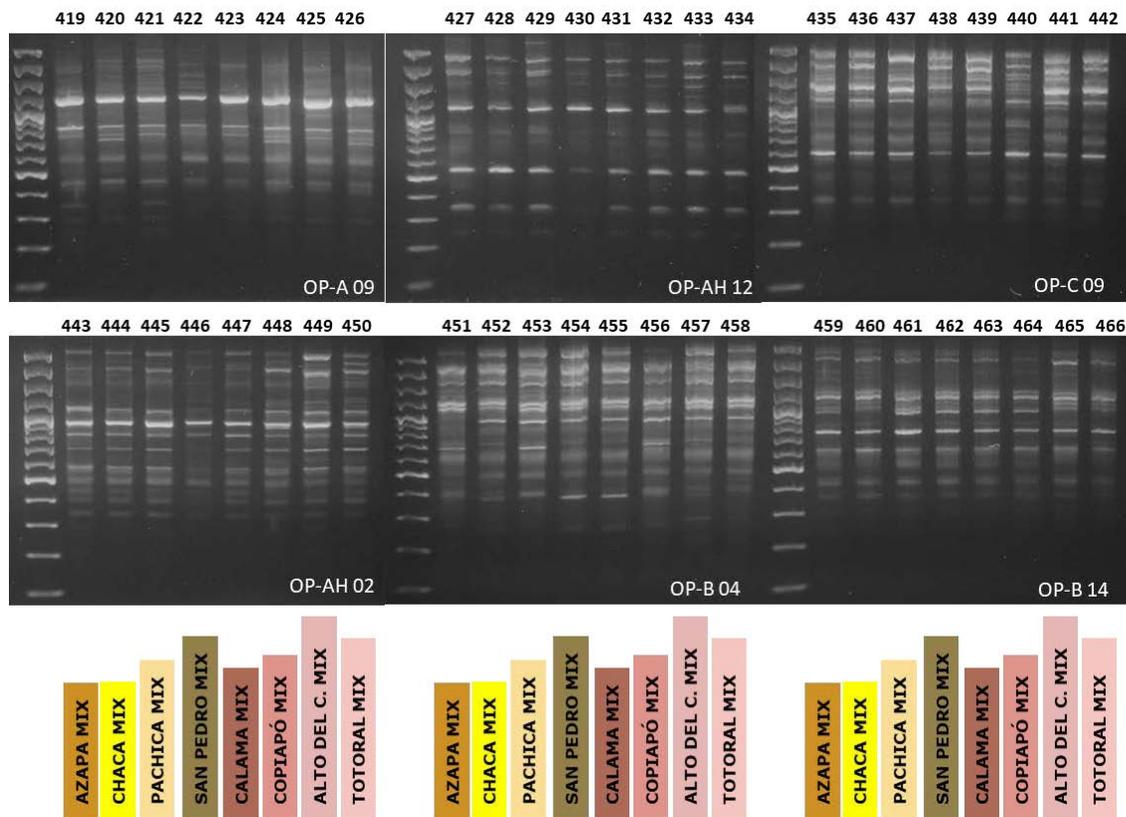


Figura 17: Perfil genético de individuos de chañar con marcador RAPD, análisis desde N°419 hasta el N°466.

El análisis de perfil genético con marcador SSR de 249 muestras de chañar del Valle de Copiapó y chañares de resto de Chile, el análisis de perfil genético de 67 chañares de otras regiones con marcador SSR y el análisis de perfil genético de 29 arropes de chañar con marcador molecular SSR y DNAcP (GdtrnL y GdmatK) se pueden observar en el ANEXO 3.



4.6.-Secuencias de ADN de Olivo y de Chañar

A través de la técnica de PCR se amplificaron regiones específicas de ADNcp (ADN de cloroplasto), en regiones *rbcL* y *trnS* de distintas muestras de olivos. Las amplificaciones de PCR es la materia prima de partida para realizar el proceso de secuenciación de ADN. Estos amplicones de PCR insertos en agarosa, fueron cortados y se aislaron a partir de un kit de purificación comercial de productos de PCR. Los productos purificados se enviaron a la empresa Macrogen para realizar su correspondiente secuenciación de ADN, específicamente usando el equipo ABI3730XL.

Para el olivo se había propuesto en el proyecto obtener 60 secuencias de ADN de sevillana del Huasco y 30 secuencias de ADN de Sevillanas de otras regiones. Como el objetivo del proyecto es comparar Sevillanas del Huasco con otras Sevillanas de otras regiones y sobre todo con otras variedades de olivo aceitero presentes en Chile (variedades según indica ChileOliva, 2015), se secuenciaron 94 muestras en total, de estas 22 muestras fueron del Valle del Huasco, 25 del Valle de Azapa y 47 de otras variedades de olivo (ver **ANEXO 4**).

En cuanto al chañar, las muestras se secuenciaron con el mismo procedimiento descrito para el olivo, sin embargo, a diferencia de la secuencia amplificada en el olivo, en el chañar se amplificó una región de ADN nuclear (ADNn) , ITS2, (en el chañar se amplificó ADN nuclear, en vez de ADNcp), región ubicada entre el gen ribosomal 5.8S y 28S. En chañar, se analizaron 100 secuencias de ADN que provenientes de muestras de Copiapó y otras regiones de Chile (ver **ANEXO 4**).

4.6.1.-Análisis de secuencias de ADN de Olivo y de Chañar

Las secuencias de ADN de olivo fueron limpiadas, alineadas y algunos nucleótidos fueron eliminados de los extremos (como es común, se eliminan nucleótidos de los extremos de la secuencia debido a que son producto de errores de lectura del secuenciador). En conclusión en el análisis de alineación no observamos ninguna diferencia polimórfica o ningún SNP (single nucleotide polymorphism) entre Sevillanas y entre variedades, tanto en la región *rbcL* como la región *trnS*, por lo tanto, estas secuencias de ADN no ayudaron a diferenciar el olivo Sevillana de las otras variedades. De hecho, no fue posible elaborar un dendograma (árbol filogenético) con estas secuencias de ADN por ser todas iguales.

Por otra parte, en cuanto al chañar, se pudieron observar 12 diferencias polimórficas en secuencias ITS obtenidas de chañares de distintas regiones, pero, en general estas secuencias fueron muy similares.

A continuación se muestra la secuencia ITS2 de 459 pb obtenida de chañar:

```
GTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCGAAGCCATTAGGCCGAGGGCACGCCTGCCTGGGCGTCACGAATCG
CCACCCAGGCCCCATCTGCCAAGGGCACTGCGGGCGGGGTGAACGCTGGCCCTCCCGTGAGCATCCGCCTCGCGGTTGGCCGAAAAATGGGTTCCGC
GGTGGAGTGACAGCGCCATGACAGACGGTGGTTGAGCGCAGTCTYAGGCCAGTCGTGCGKCTCTCTCCCCGGCGCCGGACCCGGTGACCCCGGGG
GACACCGATCGCCCTGATGCGACCTCAGGTCAGGCGGGGCTACCCGCTGAGTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAAAGAACTAACAAKGAATTC
CCTTAGTAACGGCGAGCGAACCAGGGAAGAGCCACCATGAGAATCGGTCGCCCTGGCGTCYGAATTGTAG
```

De la anterior secuencia se pudo observar 12 sitios polimórficos en 48 individuos de Chañar. En la Figura 18 se puede observar un dendograma elaborado con el programa Phylip, usando el método de agrupamiento UPGMA a partir de datos de 48 secuencias de la región ITS2 de chañar. En él se observa que una muestra de Azapa y cuatro muestras de Alto del Carmen se agrupan en un cluster distinto a la mayoría de las secuencias de chañar.

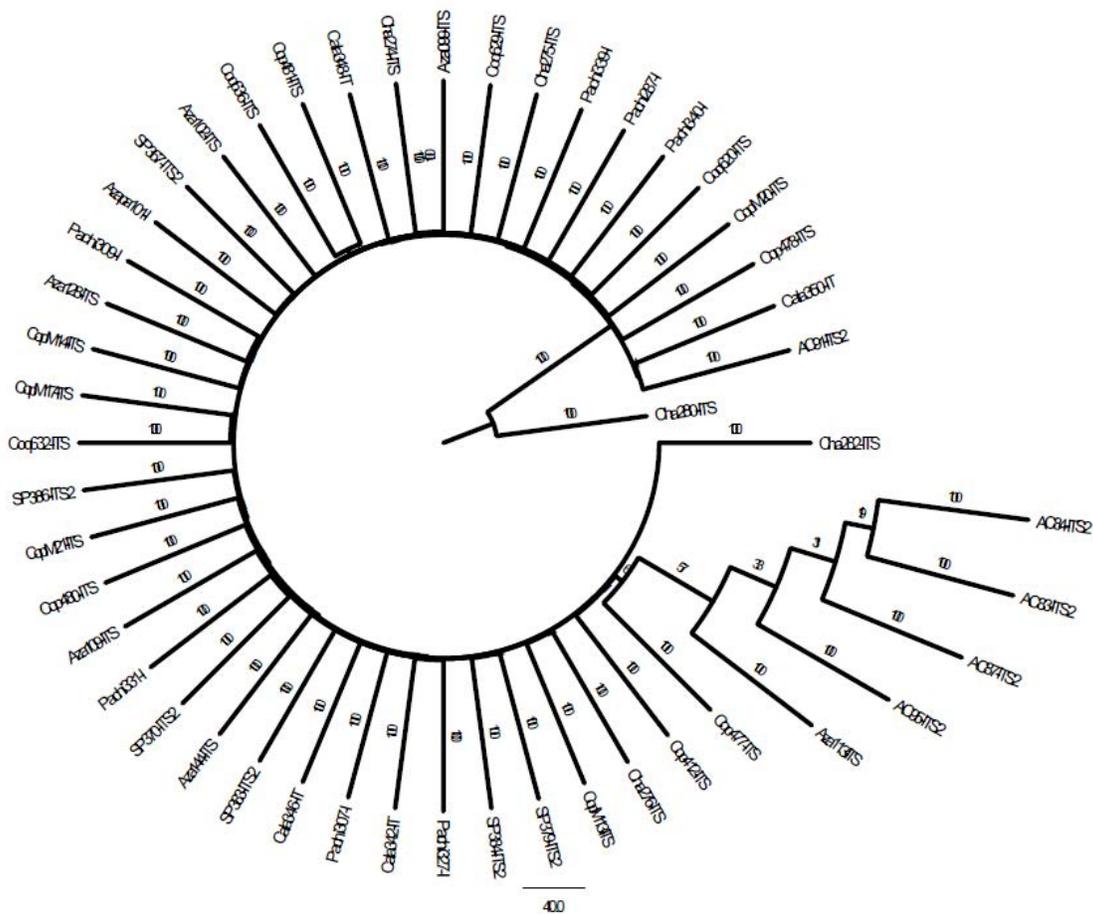


Figura 18: Dendograma obtenido con el método de agrupamiento UPGMA a partir de 48 secuencias ITS2 de chañar.



4.7.-Análisis de marcadores RAPD, ISSR y SSR de olivo

Se ha determinado con los marcadores ISSR y RAPD los perfiles genéticos de 10 variedades de olivo aceitero más empleados en Chile, además, 10 muestras de olivos centenarios de Azapa y 10 muestras de olivos centenarios de Huasco (Tabla 1). A pesar de que la mayoría de estas variedades se pueden diferenciar por las características del fruto, para efectos de una mejor precisión en la identificación se evaluó el uso de marcadores moleculares de ADN por ser una técnica más confiable. En un estudio anterior se había caracterizado el perfil genético de la variedad Sevillana de INIA (Azapa) comparada con seis variedades de olivo, a partir del marcador ISSR (Contreras y Tapia 2016), confirmándose la validez del método para diferenciar la variedad Sevillana (Azapa). Sin embargo, hasta la fecha no existe ninguna investigación de comparación de la variedad Sevillana de las localidades del Huasco y Azapa, contrastada con variedades aceitera de alto interés comercial establecidas en Chile.

Se observaron 120 fragmentos de PCR que fueron conseguidos con siete ISSR (UBC826, UBC825, UBC810, UBC881, UBC807, UBC823 y UBC811) y 25 fragmentos de PCR conseguidos con dos RAPDs (OPA-19 y OPC-09), dando un promedio de 17.1 y 12.5 fragmentos de ISSR y RAPD, respectivamente. Con estos datos, un alto rango de valores de similaridad (valores entre 0.72 - 0.96) fue observado entre genotipos de árboles centenarios de Azapa y Huasco, mientras que bajos valores de similaridad (valores entre 0.28 - 0.52) fue observado entre las variedades aceiteras y los olivos de Azapa-Huasco. Así mismo, entre los olivos centenarios Azapa 2 y Huasco 2 fue observada la mayor similaridad (0.96) y la menor similaridad fue observada entre Huasco 3 y Koroneiki (0.28).

La figura 19 muestra un dendrograma UPGMA construido con Jaccard's distance, mostrando dos principales agrupamientos, Cluster 1 y Cluster 2. Los mismos resultados de agrupamientos también fueron observados mediante análisis de componentes principales (PCA, Figura 20) y un dendrograma Neighbor joining (data not showed). En la figura 19 se puede observar que en el Cluster 1 se agruparon todos los árboles centenarios del Huasco y Azapa y, de manera aislada la muestra Sev-INIA, la cual se separó de los demás árboles centenarios formando un grupo aparte. Según el INIA, la muestra Sev-INIA es un genotipo similar a los árboles centenarios del Huasco y Azapa, pero quizás presenta una alejada relación filogenética a los olivos centenarios porque se habría originado producto de cruzamiento con variedades olivícolas locales. Por otro lado, el método mostró notoriamente diferencias de los patrones genéticos de PCR entre las variedades del Huasco-Azapa comparada con las variedades aceiteras (Figura 6 y 7). Por tanto, esto demuestra la importancia de la identificación genética de olivos para detectar genotipos originales.

Así mismo, en cuanto a los árboles centenarios de Azapa y Huasco agrupados en el Cluster 1, el genotipo Huasco 3 se separa claramente del resto de los 19 árboles centenarios.



Este genotipo muestra una clara diferencia de perfil genético al usar los marcadores UBC 810 (GA8T) y UBC811 (GA8C), comparado con el resto de los árboles centenarios del Huasco y Azapa (análisis N°49 y N° 142 de Figura 6 y 7). Este genotipo podría ser de interés porque tiene un perfil genético distinto de los olivos de Azapa, pudiendo probablemente servir como material exclusivo del Valle del Huasco y con su propia huella genética hacia el resto de Chile. Para precisar más la identificación, con los fragmentos exclusivos obtenidos de Huasco 3 se podría validar a través de la técnica SCAR, e identificar las aceitunas con que se elabora el aceite de oliva del Huasco. De confirmarse esta variabilidad, los productores del valle del Huasco en la próxima programación de plantaciones podrían multiplicar vía estacas o injertos el genotipo Huaco 3 para la DO. Otros grupos se conformaron de manera significativa dentro del mismo Cluster 1, según la Figura 1 los genotipos Azapa 5, Azapa 7, Azapa 8 y Azapa 9 se agruparon separados de los 15 restantes árboles centenarios del Huasco y Azapa. También se formaron otros tres agrupamientos significativos: Huasco 5 y Huasco 10; Huasco 1 y Huasco 2; Azapa 2 y Azapa 4. Como bien se observa los olivos del Valle del Huasco y Valle de Azapa forman grupos diferentes, siendo menor la agrupación entre genotipos del Huasco y Azapa.

La idea de comparar variedades olivícolas aceiteras más conocidas en Chile con los olivos centenarios del Huasco y Azapa, tiene como objetivo también demostrar la precisión de la caracterización genética con los marcadores moleculares ISSR y RAPD. Son varios los trabajos de caracterización genética en olivos, con marcadores ISSR y RAPD que se han llevado a cabo principalmente en países de la cuenca del mediterráneo (Claros et al 2000, Selsi and Yegenoglu 2017, Linos et al 2014). De acuerdo a las Figuras 30 y 31, se demuestra claramente que los olivos centenarios del Huasco y Azapa se separan de todas las variedades aceiteras. El cluster 2 observado en la Figura 19 se divide en varios subgrupos, siendo significativamente válidos (bootstrap mayor a 50) los subgrupos que conforma Arbosana y Arbequina y por otro lado el subgrupo que conforma Coratina y Frantoio. Esta misma tendencia de agrupamiento entre las variedades italianas Frantoio y Coratina fue también observada por Montemurro et al (2005), mediante dendrograma UPGMA a partir de datos con marcadores AFLP y SSR. Así también, Koehmstedt et al (2010) observaron agrupamiento entre las variedades españolas Arbequina y Arbusana mediante dendrograma UPGMA construido con marcadores SSR y concentradas en el Group 2 (cluster C12). Por lo tanto, los resultados de agrupamiento obtenidos con los marcadores ISSR y RAPD (Figura 19) en nuestro estudio son válidos, ya que muestra los mismos agrupamientos de variedades aceiteras evidenciados por otros estudios.

La variabilidad genética de los árboles frutales de un huerto debe ser controlado desde un principio para conseguir rendimientos uniformes. Por esto, la productividad de un huerto establecido con olivos procedentes de diferentes técnicas de multiplicación (estaca, injerto o semillas) es inapropiada. Las técnicas asexuales (estaca e injerto) aseguran individuos genéticamente idénticos al material vegetal original esperando rasgos agronómicos similares en un mismo ambiente, pero la técnica de propagación sexual (semilla) no asegura los mismos rasgos agronómicos en las mismas condiciones.



Por esto mismo, la información de cómo fueron propagados los individuos los árboles centenarios de Azapa y/o Huasco, ya sea por injerto, semilla o estacas actualmente es limitada, pudiendo existir diferencias genéticas en clones de Azapa y Huasco y diferencias dentro de una misma población. Las diferencias filogenéticas que hemos encontrado entre árboles centenarios de Azapa y Huasco (Figura 19) quizás pueda deberse a que estos provienen de distintas fuentes de material de propagación base. Es por esto que las técnicas moleculares con marcadores ISSR y RAPD son importantes porque pueden apoyar la identificación de individuos, y en el caso de la aplicación a la industria olivícola, la característica genotípica de los clones puede ser contrastada con variables agronómicas de importancia como rendimiento de frutos, resistencia a enfermedades y tolerancia al estrés abiótico, entre otros.

Un análisis molecular de varianza AMOVA fue realizado para analizar la variación entre y dentro de las poblaciones de olivos centenarios del Huasco y Azapa (Tabla 14). Si bien la mayoría de la diversidad genética total fue atribuible a diferencias entre individuos dentro de las poblaciones (79%; $P < 0.001$), los resultados demuestran que entre los árboles centenarios de Azapa y los árboles centenarios del Huasco no hay variación genética significativa (21%, $P < 0.001$). Por lo tanto, los árboles centenarios del Huasco son similares a los olivos centenarios de Azapa. Si bien éste era un resultado esperado de acuerdo a Hidalgo (1993) y Molina (2015), hasta la fecha no existía un estudio genético que lo confirmara.

Si bien los genotipos son similares entre los olivos centenarios del Huasco y de Azapa, se puede observar diferencias entre el tamaño de frutos en cada zona. En la Figura 2B se observa el valor promedio del largo de los frutos del Valle de Azapa, con un promedio 3,12 cm, siendo significativamente mayor ($p < 0.05$) al largo de los frutos de oliva del Valle del Huasco con un promedio 2,70 cm. Por otro lado, en la Figura 2C se puede observar el valor promedio del diámetro ecuatorial del fruto de oliva del Valle del Huasco con un promedio 1,88 cm y el diámetro ecuatorial del fruto de Valle de Azapa con un promedio 2,1 cm, siendo significativamente mayor ($p < 0.05$) el diámetro ecuatorial del fruto de Azapa que el del Huasco. Estos resultados nos indican que el fruto de oliva de Azapa es significativamente de mayor tamaño que el fruto de oliva del Huasco. Sin embargo, quizás estos datos no sean concluyentes, ya que el tamaño del fruto puede estar influenciado por otros factores como la época de cosecha y por prácticas agronómicas como fertilización, poda y riego, entre otros (Tapia et al 2003). En cuanto a esto, antes de comenzar el muestreo en cada zona, se procuró buscar la similitud de las prácticas de manejo agronómica en cada parcela.

Un principio fundamental biológico explica que el fenotipo es el resultado de una interacción, entre genotipo y ambiente. El fenotipo es la suma total de caracteres visibles o medibles del organismo que lo caracteriza como individuo (tales como tamaño del fruto, tolerancia al estrés y enfermedades, estados fenológicos, etc.) (Fabbri et al 2004). Cuando los mismos genotipos están sujetos a diferentes ambientes, estos pueden producir un amplio rango de fenotipos (Baye et al 2011).



En cuanto a esto, Padula et al (2008) demostraron que al establecer varios genotipos de olivo en diferentes climas observaron que el efecto del ambiente fue mayor al efecto del genotipo en cuanto al peso medio del fruto y el contenido de aceite en material base fresco. Por esto mismo, creemos que la diferencia de tamaño y peso de fruto entre Azapa y Huasco, observado en la Figura 2, puede estar influenciada por las características ambientales de cada zona, debido a que los dos valles tienen condiciones climáticas (temperatura ambiental) y edafológicas (salinidad y pH de suelo) diferentes (Antúnez et al 2014, Tapia et al 2003), y no probablemente explicada por los genotipos, ya que las poblaciones de olivo de Azapa y Huasco son prácticamente similares, con baja variabilidad genética entre ellas, según análisis AMOVA (Tabla 14). Así mismo, con los marcadores SSR se observa una alta similitud de los alelos de la Sevillana del Huasco y Sevillana de Azapa a partir de 10 marcadores SSR (ver Tabla 15). De acuerdo a Tapia et al (2003) la temperatura ambiental es uno de los factores más importantes para el desarrollo del fruto de olivo. En cuanto a lo mismo, las empresas elaboradoras y envasadoras nacionales ya habían visualizado diferencias de tamaño, de hecho ellos han utilizado genéricamente el concepto “tipo Huasco” para referirse al calibre pequeño, en relación a la aceituna del huasco, y “tipo Azapa” para referirse al calibre grande. De acuerdo a las distribuidoras, la demanda se concentra en calibres mayores, por eso la aceituna tipo Azapa concentra las preferencias del público, y la del Huasco enfrentan la exigencia de elevar el calibre de su aceituna (Hashiguchi 2005).

Específicamente en el Valle del Huasco (Región de Atacama) se produce el único aceite de oliva extra virgen nacional en proceso de Denominación de Origen (DO). Según la reglamentación establecida por los olivicultores, este aceite debe ser elaborado con al menos un 10% de la variedad Sevillana del Huasco (INAPI 2017a). De acuerdo a los resultados presentados por Tapia et al (2015), los análisis de aceites de olivas Blends evaluados en el Valle del Huasco usando mezclas de aceites de las variedades Arbequina, Frantoio y como base la Sevillana del Huasco, presenta características químicas, sensoriales y funcionales únicas e irreproducible no dadas en otras zonas olivícolas de Chile. Por lo mismo, Tapia et al (2015) proponen que para asegurar la calidad del producto final con DO es fundamental que la materia prima utilizada en la formulación de cada productor sea certificada, tal como lo exige el reglamento de uso y control. De esta manera, para determinar la caracterización genética de la materia prima (fruto), se propone usar los protocolos descritos en este estudio, para diferenciar los perfiles genéticos de las variedades a partir de la mayoría de los marcadores moleculares probados (Figura 6 y 7). Así como fue descrito por Contreras y Tapia (2016), donde se demostró la similitud de los perfiles genéticos de hoja y fruto en una misma variedad. Por lo tanto, a través de la técnica con marcadores moleculares ISSR y RAPD se puede certificar de manera más precisa la aceituna con que se elabora el aceite de oliva extra virgen del Huasco para diferenciarlas del resto de las variedades aceiteras comúnmente utilizadas en Chile, esto con el fin de apoyar la denominación de origen del aceite de oliva del Valle del Huasco.

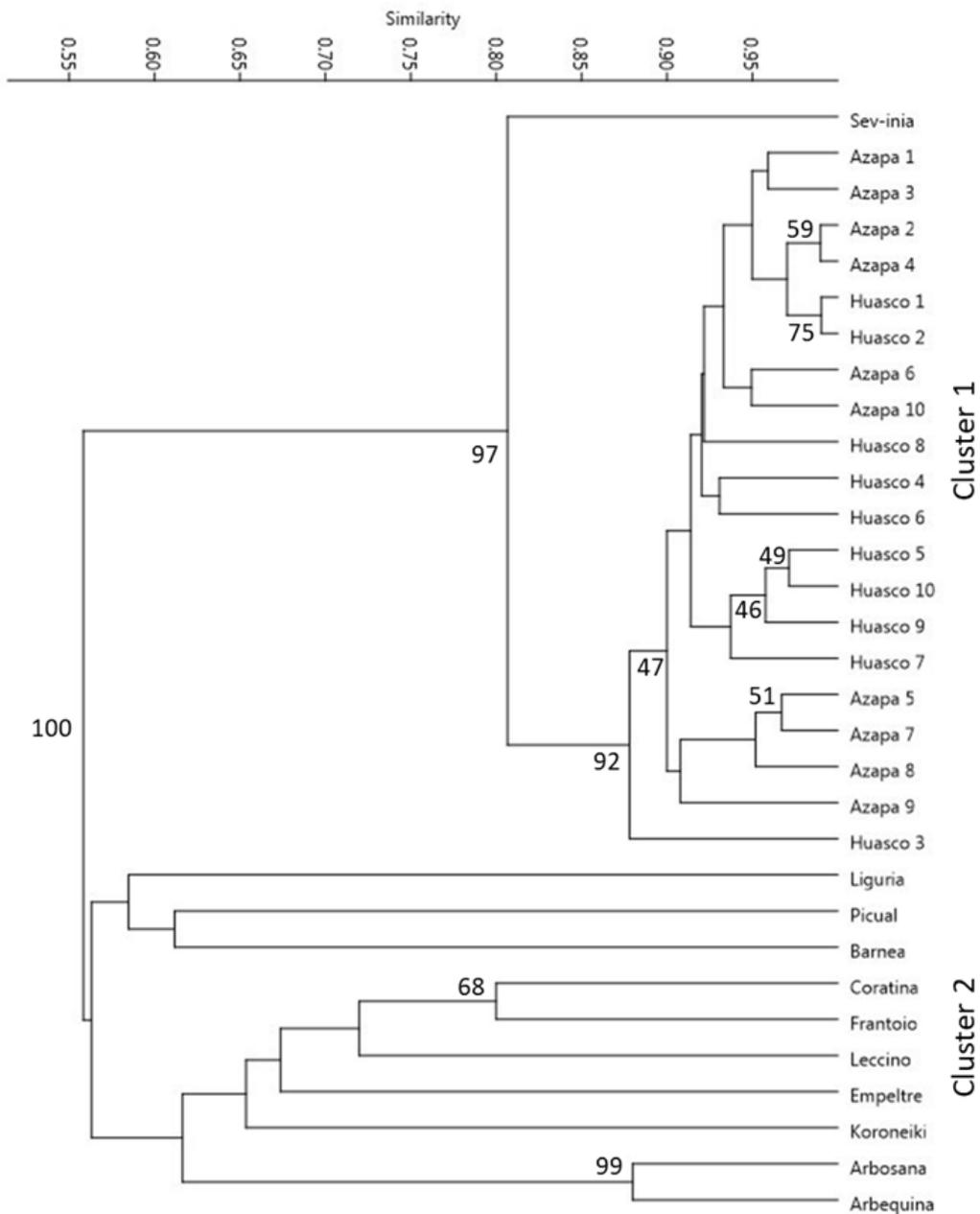


Figura 19: Análisis de conglomerados UPGMA según la similitud de Jaccard, calculado a partir de 145 marcadores obtenidos de ISSR y RAPD de ADN de variedades de olivo. Los porcentajes de valor Bootstrap están indicados por encima de 46.

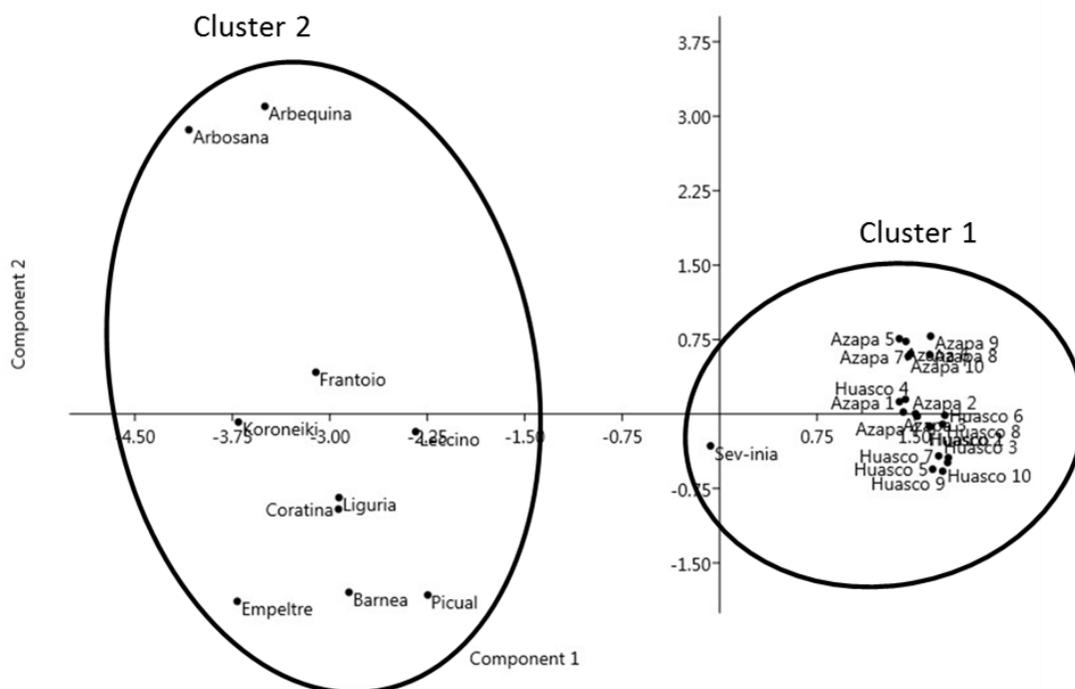


Figura 20: Análisis de componentes principales basado en marcadores ISSR y RAPD y el índice de similitud Jaccard entre 10 variedades de aceite comunes, 20 olivas centenarias de Huasco y Valle de Azapa y la variedad Sevillana INIA. El primero y el segundo componentes principales representan el 38.98% y el 8.72% de la variación genética, respectivamente.

Tabla 14. Análisis de varianza molecular (AMOVA) entre las poblaciones de árboles de Sevillana del Huasco y Sevillana de Azapa ($P < 0.001$).

| Fuente de variación | Grados de libertad | Suma de cuadrados | Media de cuadrados | Componente de la varianza | % total de varianza |
|---------------------|--------------------|-------------------|--------------------|---------------------------|---------------------|
| Entre grupos | 1 | 14,350 | 14,350 | 1,050 | 21% |
| Dentro de grupos | 18 | 69,300 | 3,850 | 3,850 | 79% |
| Total | 19 | 83,650 | | 4,900 | 100% |



Tabla 15: Diferencias de tamaño de alelo de variedades de oliva analizadas por Trujillo et al (2014), Koehmstedt et al (2010) y de las variedades analizadas con marcadores SSR. Los valores destacados en gris son incongruencias de datos del citado autor comparado con los datos de este proyecto.

| Variedad | Referencia y N° de muestras | DCA11 | DCA11 | DCA15 | DCA15 | DCA18 | DCA18 | DCA3 | DCA3 | UDO99-011 | UDO99-011 | GAPU89 | GAPU89 | GAPU103 | GAPU103 | GAPU82 | GAPU82 | DCA8 | DCA8 | UDO99-043 | UDO99-043 |
|---------------|-----------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|------|------|-----------|-----------|--------|--------|---------|---------|--------|--------|------|------|-----------|-----------|
| | (1) | 140 | 178 | 243 | 254 | 166 | 176 | 237 | 247 | 116 | 119 | 158 | 206 | 133 | 133 | 186 | 188 | 135 | 139 | 172 | 216 |
| | (2) | 141 | 141 | | | | | 238 | 248 | 111 | 113 | 158 | 205 | | | | | 136 | 140 | | |
| Huasco Valley | 10 | 141 | 141 | 243 | 254 | 167 | 177 | 238 | 248 | 111 | 113 | 158 | 205 | 133 | 133 | 184 | 184 | 136 | 140 | 173 | 217 |
| Azapa Valley | 10 | 141 | 141 | 243 | 254 | 167 | 177 | 238 | 248 | 111 | 113 | 158 | 205 | 133 | 133 | 184 | 184 | 136 | 140 | 173 | 217 |
| | (1) | 140 | 178 | 243 | 243 | 164 | 174 | 229 | 241 | 116 | 129 | 158 | 158 | 147 | 157 | 186 | 186 | 137 | 137 | 175 | 175 |
| | (2) | 141 | 141 | | | | | 230 | 242 | 111 | 123 | 158 | 158 | | | | | 138 | 138 | | |
| Arbequina | 1 | 141 | 141 | 243 | 243 | 165 | 175 | 230 | 242 | 111 | 123 | 158 | 158 | 147 | 157 | 182 | 182 | 138 | 138 | 175 | 175 |
| | (1) | 134 | 140 | 243 | 243 | 164 | 176 | 229 | 241 | 116 | 119 | 158 | 206 | 157 | 171 | 173 | 186 | 129 | 137 | 175 | 208 |
| | (2) | 135 | 141 | | | | | 230 | 242 | 111 | 113 | 158 | 205 | | | | | | | | |
| Arbusana | 1 | 135 | 141 | 243 | 243 | 175 | 177 | 230 | 242 | 111 | 113 | 158 | 205 | 157 | 171 | 182 | 182 | 130 | 138 | 175 | 209 |
| | (1) | 140 | 152 | 243 | 243 | 172 | 174 | 229 | 229 | 125 | 125 | 172 | 193 | 174 | 186 | 186 | 186 | 135 | 135 | 166 | 175 |
| | (2) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Barnea | 1 | 141 | 153 | 243 | 243 | 173 | 175 | 230 | 230 | 119 | 119 | 173 | 193 | 175 | 185 | 182 | 182 | 134 | 134 | 167 | 175 |
| | (1) | 130 | 170 | 243 | 243 | 172 | 176 | 237 | 241 | 114 | 131 | 158 | 174 | 133 | 159 | 186 | 186 | 139 | 139 | 175 | 198 |
| | (2) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Coratina | 1 | 131 | 131 | 243 | 243 | 173 | 177 | 238 | 242 | 109 | 125 | 158 | 175 | 133 | 159 | 182 | 182 | 140 | 140 | 175 | 199 |
| | (1) | 140 | 178 | 243 | 243 | 166 | 176 | 241 | 243 | 114 | 125 | 156 | 168 | 147 | 171 | 188 | 188 | 129 | 134 | 187 | 216 |
| | (2) | 141 | 141 | | | | | 242 | 244 | 109 | 119 | 156 | 168 | | | | | | | | |
| Empeltre | 1 | 141 | 141 | 243 | 243 | 167 | 177 | 242 | 244 | 109 | 119 | 156 | 168 | 147 | 171 | 184 | 184 | 130 | 134 | 188 | 216 |
| | (1) | 130 | 178 | 243 | 243 | 172 | 174 | 234 | 241 | 114 | 125 | 158 | 193 | 159 | 171 | 186 | 186 | 134 | 139 | 175 | 214 |
| | (2) | 131 | 131 | | | | | 236 | 242 | 109 | 119 | 158 | 194 | | | | | 134 | 140 | | |
| Frantoio | 1 | 131 | 131 | 243 | 243 | 173 | 175 | 236 | 242 | 109 | 119 | 158 | 193 | 159 | 171 | 182 | 182 | 134 | 140 | 175 | 211 |
| | (1) | 140 | 146 | 261 | 263 | 168 | 170 | 237 | 237 | 123 | 125 | 158 | 193 | 147 | 157 | 186 | 186 | 137 | 145 | 170 | 214 |
| | (2) | 141 | 147 | | | | | 238 | 238 | 117 | 119 | 158 | 194 | | | | | 134 | 136 | | |
| Koroneiki | 1 | 141 | 147 | 243 | 243 | 169 | 171 | 238 | 238 | 117 | 119 | 158 | 193 | 147 | 157 | 182 | 182 | 134 | 136 | 172 | 216 |
| | (1) | 130 | 178 | 254 | 254 | 172 | 172 | 241 | 251 | 114 | 134 | 158 | 206 | 171 | 184 | 186 | 186 | 135 | 135 | 210 | 214 |
| | (2) | 131 | 131 | | | | | 242 | 252 | 109 | 127 | 158 | 205 | | | | | 134 | 136 | | |
| Leccino | 1 | 131 | 131 | 254 | 254 | 171 | 173 | 242 | 252 | 109 | 127 | 158 | 205 | 171 | 185 | 182 | 182 | 134 | 136 | 212 | 214 |
| | (1) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | (2) | 135 | 135 | | | | | 238 | 254 | 119 | 125 | 158 | 158 | | | | | 134 | 140 | | |
| Liguria | 1 | 135 | 135 | 254 | 254 | 169 | 177 | 238 | 254 | 119 | 125 | 158 | 158 | 159 | 171 | 182 | 182 | 134 | 140 | 174 | 176 |
| | (1) | 140 | 176 | 243 | 254 | 166 | 172 | 237 | 247 | 116 | 119 | 158 | 174 | 133 | 133 | 186 | 186 | 139 | 139 | 208 | 212 |
| | (2) | 141 | 141 | | | | | 238 | 248 | 111 | 113 | 158 | 175 | | | | | 136 | 140 | | |
| Picual | 1 | 141 | 141 | 243 | 254 | 167 | 173 | 238 | 248 | 111 | 113 | 158 | 175 | 133 | 133 | 182 | 182 | 136 | 140 | 208 | 210 |
| | (1) | 160 | 178 | 243 | 243 | 168 | 172 | 229 | 247 | 103 | 119 | 158 | 174 | 133 | 171 | 186 | 186 | 134 | 135 | 175 | 210 |
| | (2) | 161 | 161 | | | | | 230 | 248 | 99 | 113 | 158 | 175 | | | | | 134 | 136 | | |
| Ascolana T. | 1 | 161 | 161 | 243 | 243 | 169 | 173 | 230 | 248 | 99 | 113 | 158 | 175 | 133 | 171 | 182 | 182 | 134 | 136 | 175 | 210 |
| | (1) | 140 | 160 | 254 | 254 | 168 | 176 | 243 | 251 | 119 | 134 | 158 | 206 | 133 | 147 | 173 | 186 | 137 | 137 | 210 | 212 |
| | (2) | 141 | 161 | | | | | 244 | 252 | 113 | 127 | 158 | 205 | | | | | 136 | 138 | | |
| Manzanilla | 1 | 141 | 161 | 254 | 254 | 169 | 177 | 244 | 252 | 113 | 127 | 158 | 205 | 133 | 147 | 182 | 182 | 136 | 138 | 210 | 212 |
| | (1) | 160 | 178 | 243 | 243 | 172 | 176 | 247 | 251 | 119 | 127 | 174 | 206 | 133 | 184 | 186 | 186 | 135 | 135 | 172 | 212 |
| | (2) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Gordal S. | 1 | 161 | 161 | 243 | 243 | 173 | 177 | 248 | 252 | 113 | 121 | 175 | 205 | 133 | 185 | 182 | 182 | 134 | 136 | 173 | 213 |
| | (1) | 134 | 161 | 262 | 263 | 180 | 183 | 229 | 251 | 114 | 119 | 168 | 206 | 159 | 184 | 188 | 188 | 135 | 135 | 208 | 214 |
| | (2) | 135 | 160 | | | | | 244 | 252 | 109 | 113 | 168 | 205 | | | | | 134 | 136 | | |
| Kalamata | 1 | 141 | 141 | 243 | 243 | 175 | 177 | 238 | 242 | 113 | 119 | 156 | 205 | 133 | 171 | 184 | 184 | 134 | 136 | 188 | 217 |

Trujillo et al 2014 (1); Koehmstedt et al 2010 (2)



4.8.-Análisis de marcadores RAPD e ISSR de chañar

En cuanto a Chañar, de los 38 especímenes examinados (Tabla 2), los ocho cebadores ISSR pudieron generar 142 bandas con capacidad de clasificación (en promedio, 18 bandas se amplificaron por cebador ISSR), de las cuales 138 (97%) fueron polimórficas (Tabla 16). Para todos los iniciadores ISSR, el tamaño de los productos amplificados varió de 250 a 3000 pb. El número total máximo de bandas (TNB) fue 21 (UBC823) y el mínimo 14 (UBC807). El cebador UBC811 fue capaz de distinguir 37 genotipos de *G. decorticans* y el cebador UBC807 26 (NG). El poder de resolución (Rp) de los cebadores ISSR varió de 4.2105 (UBC807) a 12.2105 (UBC811). Para todos los cebadores ISSR analizados, solo el cebador UBC826 presentó bandas exclusivas (NEB). El PIC se calculó para cada cebador, con UBC811 mostrando el valor de PIC más alto (0,41) y UBC807 el más bajo (0,22). El valor promedio de PIC para los ocho cebadores ISSR fue 0,31 (Tabla 16). Los tres cebadores RAPD fueron capaces de generar 38 bandas con capacidad para medir (13 bandas en promedio fueron amplificadas por primer RAPD) de los cuales 32 (81%) fueron polimórficos. Para todos los cebadores RAPD, el tamaño de los productos amplificados varió de 270 a 3.000 pb (Tabla 16). El número total máximo de bandas (TNB) fue 22 (OPAI-05) y el mínimo 7 (OPB-19). El cebador OPAI-05 fue capaz de distinguir 35 genotipos de *G. decorticans* y el cebador 13 de OPB-19 (NG). El poder de resolución (Rp) de los cebadores RAPD varió de 2.7368 (OPB-19) a 10.8421 (OPAI-05). En cuanto a los cálculos de PIC, el cebador OPAI-05 reveló un valor máximo de 0,33, mientras que con OPF-08 se obtuvo un valor mínimo de 0,22. El valor promedio de PIC obtenido para tres RAPD fue 0.26 (Tabla 16). Los productos de amplificación obtenidos en *G. decorticans* por los cebadores UBC823, UBC807, UBC815, OPAI-05 y OPB-19 se ilustran en la Figura 18, 19, 20 y 21, que muestra el patrón electroforético típico observado.

El análisis de varianza molecular (AMOVA) de nueve poblaciones de *G. decorticans* indicó que la mayoría de la varianza total era atribuible a la variación genética dentro de las poblaciones (65%) en lugar de entre ellas (35%) (Tabla 17).



Tabla 16: Información de cebadores ISSR y RAPD utilizados para el análisis genético de *Geoffroea decorticans*. Número total de bandas (TNB), número de bandas polimórficas (NPB) al 99 %, porcentaje de bandas polimórficas (P%) al 99 %, poder de resolución (Rp), número de genotipos diferentes (NG), número de bandas exclusivas (NEB) y contenido de información polimórfica (PIC).

| Primer | Secuencia | Tamaño | TNB | NPB (99 %) | P% (99 %) | NG | Rp | NEB | PIC |
|----------|----------------------|---------------|-----|------------|-----------|----|---------|------|--------|
| | | banda (pb) | | | | | | | |
| UBC880 | (GGAGA) ₃ | 350-3000 | 18 | 17 | 94 | 36 | 7.5789 | 0 | 0.2966 |
| UBC823 | (TC) ₈ C | 550-3000 | 21 | 21 | 100 | 31 | 11.0526 | 0 | 0.3558 |
| UBC815 | (CT) ₈ G | 500-3000 | 17 | 17 | 100 | 31 | 8.2105 | 0 | 0.3375 |
| UBC811 | (GA) ₈ C | 300-3000 | 19 | 19 | 100 | 37 | 12.2105 | 0 | 0.4110 |
| UBC825 | (AC) ₈ T | 330-2000 | 15 | 14 | 93 | 33 | 6.8421 | 0 | 0.2814 |
| UBC807 | (AG) ₈ T | 280-3000 | 14 | 13 | 93 | 26 | 4.2105 | 0 | 0.2254 |
| UBC826 | (AC) ₈ C | 250-1500 | 19 | 18 | 95 | 31 | 8.1053 | 2 | 0.2882 |
| UBC856 | (AC) ₈ YA | 280-2000 | 19 | 19 | 100 | 32 | 7.7368 | 0 | 0.2956 |
| TOTAL | | | 142 | 138 | | | | 2 | |
| Promedio | | | 18 | | 97 | 32 | 8.2434 | 0.25 | 0.3114 |
| OPB-19 | ACCCCGAAG | 590-3000 | 7 | 6 | 86 | 13 | 2.7368 | 0 | 0.2473 |
| OPF-08 | GGGATATCGG | 550-3000 | 9 | 6 | 67 | 17 | 3.1579 | 0 | 0.2262 |
| OPAI-05 | GTCGTAGCGG | 270-3000 | 22 | 20 | 91 | 35 | 10.8421 | 0 | 0.3306 |
| TOTAL | | | 38 | 32 | | | | 0 | |
| Promedio | | | 13 | | 81 | 22 | 5.5789 | 0 | 0.2681 |

Y = C, T.

Tabla 17: Análisis de varianza molecular (AMOVA) para nueve poblaciones de *Geoffroea decorticans* ($P < 0.001$).

| Fuente de variación | Grados de libertad | Suma de cuadrados | Media de cuadrados | Componente de la varianza | % total de varianza |
|---------------------|--------------------|-------------------|--------------------|---------------------------|---------------------|
| Entre grupos | 8 | 447,650 | 55,956 | 9,451 | 35% |
| Dentro de grupos | 29 | 508,350 | 17,529 | 17,529 | 65% |
| Total | 37 | 956,000 | | 26,981 | 100% |

El análisis de conglomerados genéticos de los 38 individuos de *G. decorticans* se generó utilizando el método del grupo de pares no ponderados con la media aritmética (UPGMA) basada en la similitud de Jaccard. El dendograma mostró un patrón idéntico de agrupamiento usando la matriz de similitud de datos. La Figura 21 muestra un dendograma de los tres conglomerados principales, con los dos mayores divididos sobre la base de las distribuciones norte y sur.



El grupo I incluyó 11 individuos (CoM6, CoM17, CoM18, CoM20, Des07, Des35, El618, Cq636, AC84, AC87 y AC91) que comprenden el área sur, el grupo II consistió en 25 individuos (CH280, CH282, SP378, SP383, CA342, SP381, SP384, CA343, CA346, PA289, PA326, PA316, PA336, PA307, AZ113, AZ109, CO477, CO479, CO479, CO480, CO481, COM21, CH278, AZ128 y AZ139), la mayoría de ellos en la zona norte, con a excepción de los ejemplares de Copiapó. El grupo III incluyó 2 individuos de Calama (CA348 y CA350). Además, el clúster I se dividió en tres subgrupos (DES, COQ y AC), el clúster II en cinco (AZ, CHA, CA, PA y CO) y el clúster III en un solo subgrupo (CA) (Figura 21). El análisis del componente principal (PCA) reveló que los primeros tres componentes (Componente 1, 2 y 3) explicaron 14.9%, 10.9% y 6.6% de la variación total, respectivamente. La ordenación bidimensional confirmó los resultados del análisis de conglomerados, mostrando dos grupos principales de las áreas norte y sur, sin embargo, algunos individuos de las poblaciones de Copiapó (CO477, CO478, CO479, CO480 y CO481) y Pachica (todos los individuos de AP) estaban claramente separados del resto (Figura 22). Para las nueve poblaciones de *G. decorticans*, la distancia genética promedio de Nei fue de 0,244, variando de 0,140 (entre San Pedro y Calama) a 0,442 (entre Pachica y Coquimbo) (Tabla 18).

Tabla 18: Distancia genética de Nei entre nueve poblaciones de *Geoffroea decorticans*.

| | Azapa | Chaca | Pachica | San Pedro | Calama | Copiapó | Mouth-River | Alto Carmen | Coquimbo |
|-------------|-------|-------|---------|-----------|--------|---------|-------------|-------------|----------|
| Azapa | 0.000 | | | | | | | | |
| Chaca | 0.183 | 0.000 | | | | | | | |
| Pachica | 0.254 | 0.304 | 0.000 | | | | | | |
| San Pedro | 0.212 | 0.165 | 0.293 | 0.000 | | | | | |
| Calama | 0.243 | 0.204 | 0.328 | 0.140 | 0.000 | | | | |
| Copiapó | 0.164 | 0.168 | 0.298 | 0.154 | 0.147 | 0.000 | | | |
| Mouth-River | 0.291 | 0.244 | 0.386 | 0.247 | 0.271 | 0.205 | 0.000 | | |
| Alto Carmen | 0.261 | 0.240 | 0.427 | 0.192 | 0.203 | 0.172 | 0.192 | 0.000 | |
| Coquimbo | 0.303 | 0.287 | 0.442 | 0.261 | 0.267 | 0.214 | 0.231 | 0.210 | 0.000 |

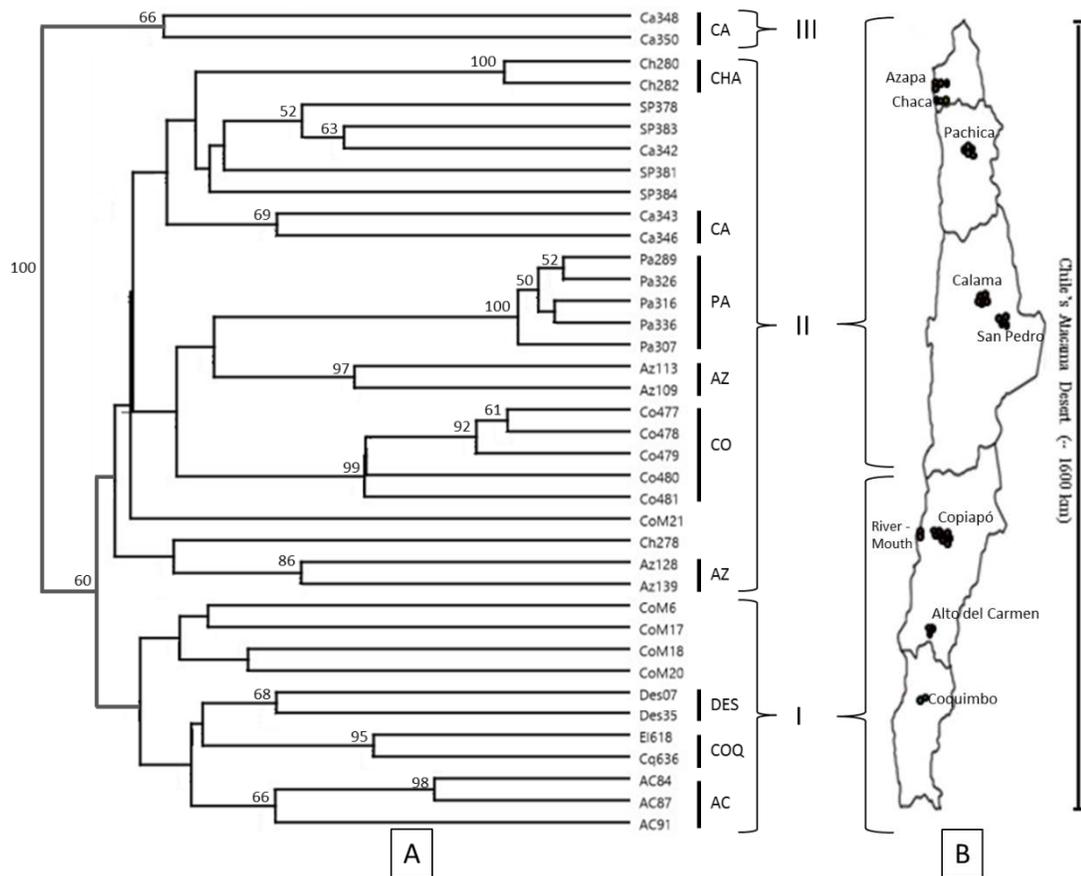


Figura 21: A) Análisis de cluster de UPGMA basado en la similitud de Jaccard, calculado sobre la base de 180 marcadores obtenidos de ISSR y RAPD. Se indican los porcentajes de valores de Bootstrap por encima de 50. B) Mapa del norte de Chile muestra la ubicación de las poblaciones de Chañar (Azapa = AZ; Chaca = CHA; Pachica = PA; Calama = CA; San Pedro = SP; Copiapó Río-boca = DES; Copiapó = CO; Alto del Carmen = AC ; Coquimbo = COQ).

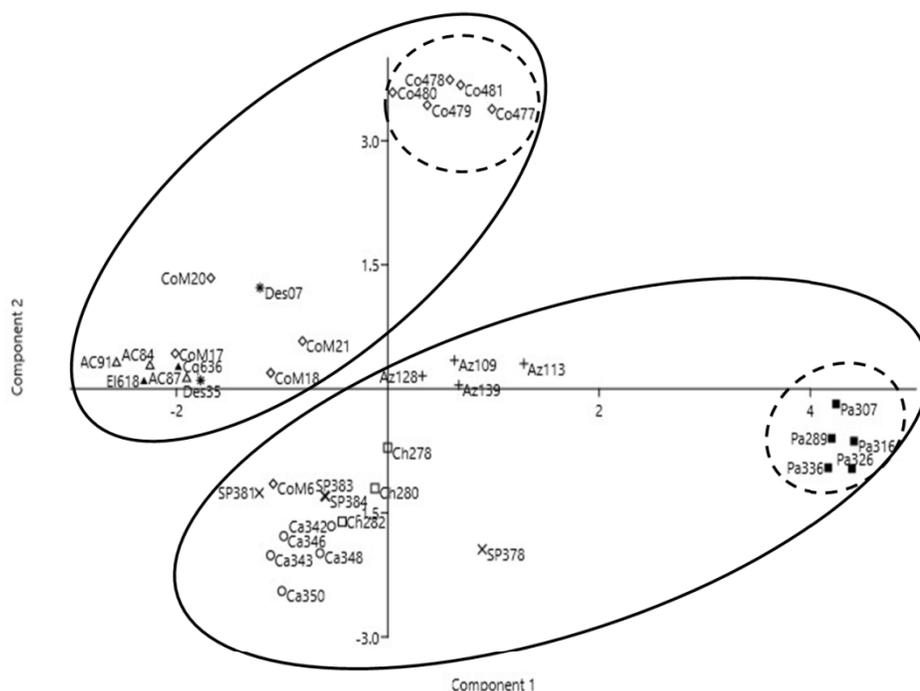


Figure 22: Análisis de componentes principales basado en los marcadores ISSR y RAPD y el índice de similitud de Jaccard entre 38 individuos de Chañar. El primer y segundo componente principal representan el 14.9% y el 10.9% de la variación genética, respectivamente.

La prueba de Mantel no mostró una correlación significativa entre la distancia geográfica y genética para nueve poblaciones ($r = 0.18$, $P = 0.01$) (Figura 23A), aunque se encontró una correlación significativamente positiva ($r = 0.58$, $P = 0.02$) para siete poblaciones (Figura 23B). Los índices de diversidad promedio de Shannon Weaver de las poblaciones de Pachica, río Copiapó y Coquimbo fueron 0.089, 0.127 y 0.102 respectivamente, significativamente ($P \leq 0.05$) más bajos que los de las poblaciones de San Pedro, Calama, Azapa y Copiapó, que exhibieron altos valores de 0.297, 0.355, 0.358 y 0.362 respectivamente (Figura 24); Chaca (0,303) y Alto del Carmen (0,242), por otro lado, mostraron índices medios de diversidad de Shannon Weaver no significativamente ($P \leq 0.05$) diferentes a los de las poblaciones restantes (Figura 24).

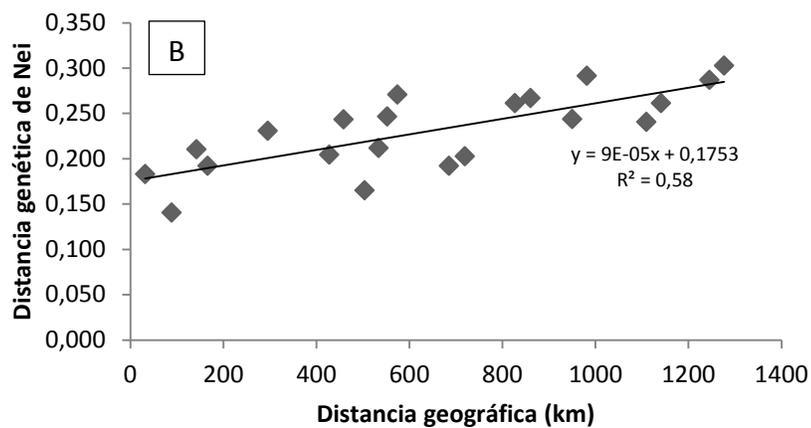
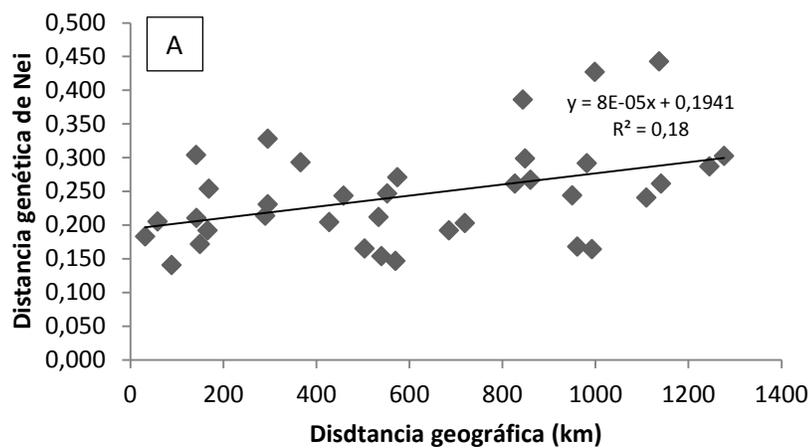


Figura 23: Relación entre la distancia genética y la distancia geográfica entre las poblaciones de *Geoffroea decorticans*. A) nueve poblaciones de Chañar: AZ, CHA, PA, SP, CA, CO, DES, ADC, COQ. B) siete poblaciones de Chañar: AZ, CHA, SP, CA, DES, ADC, COQ.

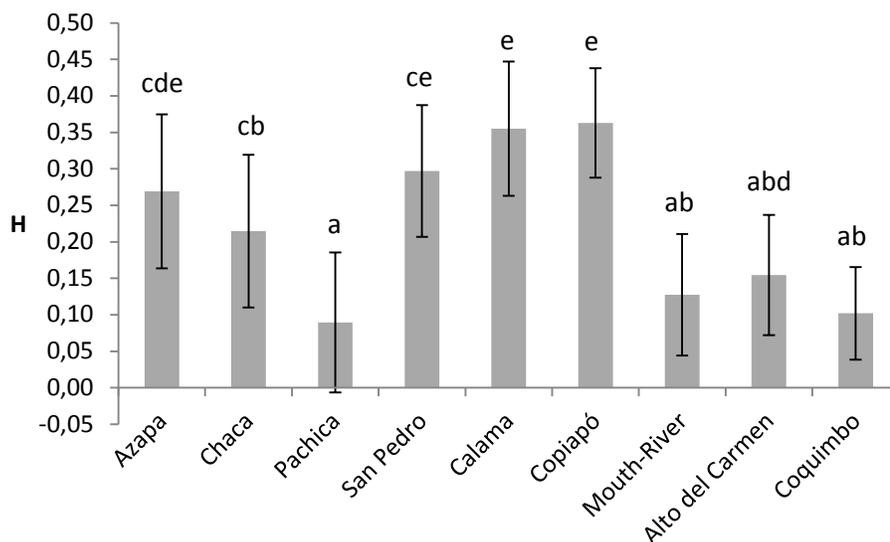


Figura 24: Promedio de índice de diversidad de Shannon-Weaver (H) de nueve poblaciones de *Geoffroea decorticans*. Las barras que comparten la misma letra no son significativamente diferentes según la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$). Barras muestran DS.

En los casos donde la información genómica y las secuencias de ADN de una especie vegetal no están disponibles, los marcadores moleculares ISSR y RAPD ofrecen una alternativa útil para los estudios de diversidad genética. En este proyecto se realizó el primer estudio molecular que evalúa la diversidad genética de *G. decorticans* (chañar). En este estudio, ocho cebadores ISSR y tres RAPD produjeron 180 bandas reproducibles, de las cuales 97% y 81%, respectivamente, eran polimórficas. Otros Fabaceae estrechamente relacionado con los géneros *Geoffroea* (como *Dalbergia* y *Pterocarpus*, Lavin et al. 2001), tales como *D. oliveri* (Phong et al. 2011) y *D. sissoo* (Arif et al. 2009), tienen menos bandas polimórficas (38.6% y 56.7%, respectivamente), y poco contenido de información polimórfica (PIC) usando cebadores ISSR y RAPD; *P. angolensis* (Chishakumu et al., 2009) por otro lado demuestran valores más altos, con 88% de bandas polimórficas usando RAPDs. Nuestros resultados también revelan que el polimorfismo en *G. decorticans* es superior a otras especies de árboles del desierto, por ejemplo *Haloxylon ammodendron*, que muestran polimorfismo en el 84% de las bandas (Sheng et al. 2005), y *Acacia Senegal*, con menos de 55,6% bandas polimórficas (Josiah et al. 2008). Además, los marcadores ISSR y RAPD podrían usarse como un método alternativo para identificar y distinguir genotipos de *G. decorticans* de interés.



Por ejemplo, Jiménez-Aspee et al. (2017) concluyen la necesidad de realizar una caracterización genética de genotipos de chañar, ya que revelaron una química diferente en poblaciones de *G. decorticans*. Además demostramos que, en *G. decorticans*, los cebadores ISSR tienen mayor incidencia de polimorfismo que los cebadores RAPD. En resumen, la información polimórfica encontrada en *G. decorticans* usando marcadores ISSR es alta en comparación con otras especies de la misma familia y especies de árboles del desierto en general.

Los resultados de AMOVA para nueve poblaciones muestran que se conserva un alto nivel de variación genética dentro de las poblaciones (65%) y un nivel moderado entre la diversidad de la población (35%). Los chañares con la variación genética intrapoblacional más alta revelan una diferenciación poblacional limitada. Esto es potencialmente el resultado de las condiciones extremadamente áridas en Atacama, que presentan una barrera significativa a la dispersión de genes. El desierto de Atacama es el más seco del mundo, y ciertamente la región árida más antigua del mundo (Clarke 2006).

Las muestras de Pachica muestran una clara separación del resto de individuos de *G. decorticans*, lo que sugiere la posibilidad de una fragmentación notoria y puede haber evidenciado un fuerte endemismo. Los chañares en Pachica ocupan un área total relativamente pequeña, con condiciones ambientales más hostiles en relación con el resto de la región de muestreo. Pocos chañares se encuentran aquí establecidos, debido a la baja disponibilidad de agua, la alta salinidad y la falta de cubierta vegetal circundante, y estas condiciones dan como resultado un flujo restringido de genes a poblaciones externas. Por otro lado, los cinco chañares de Copiapó (CO477, CO478, CO479, CO480 y CO481) están agrupados en un solo grupo, que puede representar un antiguo refugio forestal. Esto debido a que tienen un gran diámetro del tronco ~ 80 cm (medido a un metro de la base) en relación con otros especímenes muestreados (<40 cm).

La pequeña distancia genética Nei entre las poblaciones de Calama y San Pedro es lo esperado dada su proximidad geográfica cercana (~ 100 km). Por el contrario, la gran distancia genética entre las poblaciones de Pachica y Coquimbo es consistente con la gran distancia geográfica (~ 1384 km) y la aridez extrema, que actúa como una barrera para el flujo de genes.



En el análisis inicial de nueve poblaciones, la prueba de Mantel reveló una correlación negativa entre las distancias geográficas y genéticas ($r = 0.18$).

Sin embargo, al excluir las poblaciones de Pachica y Copiapó sobre la base de las grandes diferencias reveladas por la PCA, la correlación se vuelve significativamente positiva ($r = 0,58$), lo que indica un aislamiento significativo por distancia. Se observaron efectos comparables de aislamiento por distancia en poblaciones naturalmente fragmentadas del árbol *Potentilla ikonnikovii* en el desierto de Gobi (Wesche et al., 2006) y *Plumbago zeylanica* en India (Panda et al., 2015). Además, las poblaciones de *G. decorticans* en este estudio demuestran una correlación negativa entre la altitud (m a.s.l.) y la distancia genética, tanto para nueve y siete poblaciones (datos no mostrados).

El índice de diversidad de Shannon-Weaver muestra niveles significativamente bajos de diversidad genética con respecto a las poblaciones de Pachica, río Copiapó, boca del Alto del Carmen y Coquimbo. Esto puede deberse a la barrera a la dispersión de polen presentada por el desierto de Atacama, lo que resulta en el aislamiento de estas poblaciones. El flujo restringido de genes en estas condiciones es ampliamente reconocido como un factor que afecta la diversidad genética (Wesche et al., 2006). Por el contrario, las poblaciones de Calama-San Pedro y Copiapó muestran una diversidad genética significativamente alta en relación con las poblaciones mencionadas anteriormente. Creemos que esto puede deberse al hecho de que los *G. decorticans* crecen como bosques a densidades excepcionalmente altas en grandes áreas en estas regiones. En la región de Atacama, estos bosques nativos comprenden un área combinada de 900 hectáreas, dominada por *G. decorticans*, así como por *Acacia caven* y *Prosopis chilensis* (Squeo et al., 2008). Es posible que estas áreas hayan contenido históricamente extensos bosques de *G. decorticans*. Por lo tanto, los sitios de Calama-San Pedro y Copiapó tienen suficiente cobertura forestal y pueden adquirir niveles más altos de diversidad genética, posiblemente como resultado de un mayor flujo de genes. Pither et al. (2003) registraron un resultado similar en *Terminalia amazonia*, atribuyeron a sitios con suficiente cobertura forestal adquirieron mayor nivel de diversidad genética, mientras que las poblaciones en sitios con cubierta forestal bajo esperaban un bajo nivel de diversidad genética

4.9.-Kit de identificación genética de aceituna y aceite de oliva

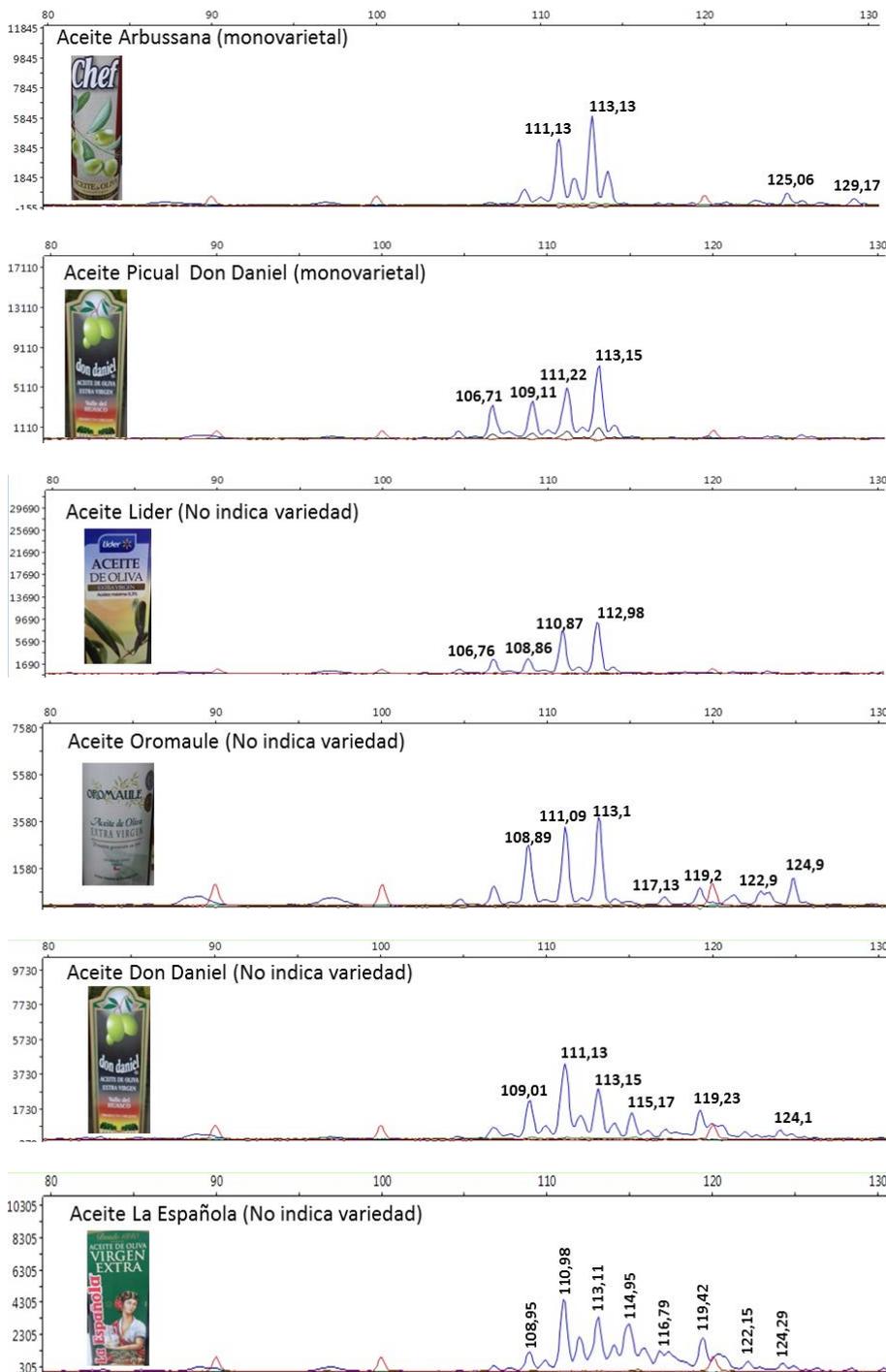
El kit de identificación genética de aceituna y aceite de oliva consta de dos métodos: el primero se trata sobre la extracción de ADN del tejido, en este caso de tejido de aceituna y de aceite, descrito en los ítems 3.4.1 y 3.4.2, respectivamente, y el segundo método se trata sobre la identificación de la variedad de olivo, usando la reacción en cadena de las polimerasas (PCR), la preparación de esta reacción se describe en el ítem 3.4.5. Los productos usados para la identificación genética de los alimentos a base de olivo se describen a continuación:

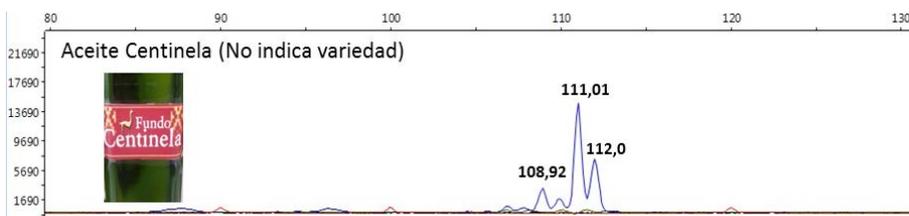
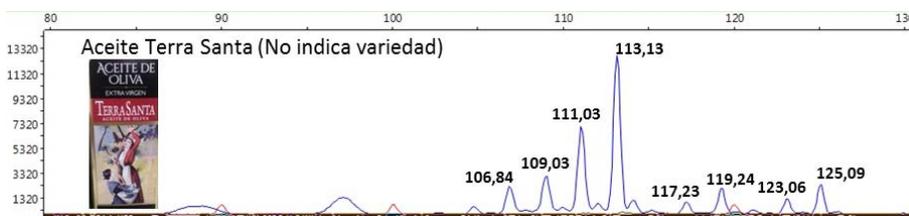
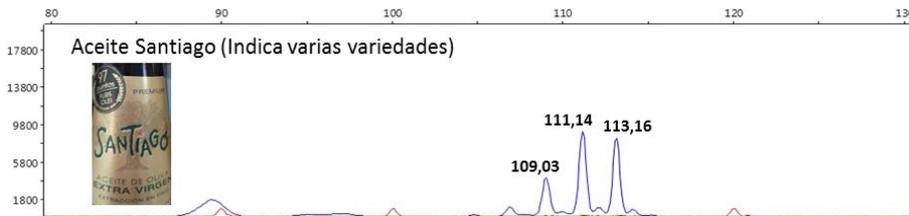
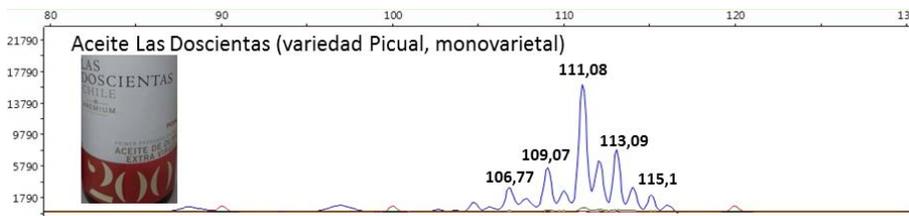
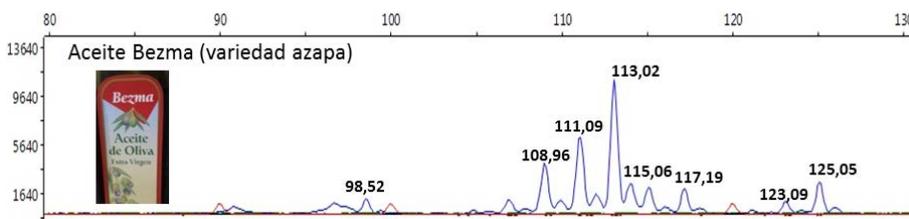
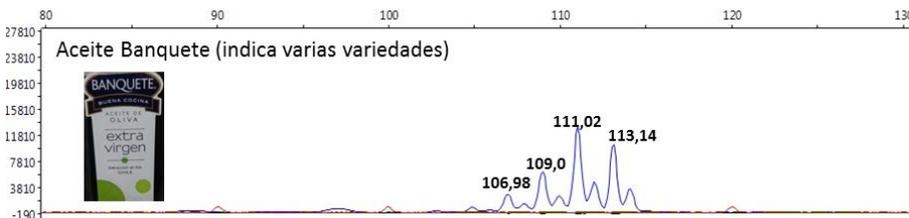
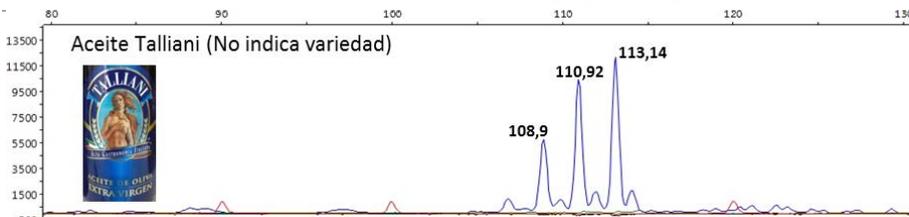
Tabla 19: Productos utilizados para el kit de identificación genética de alimentos a base de olivo

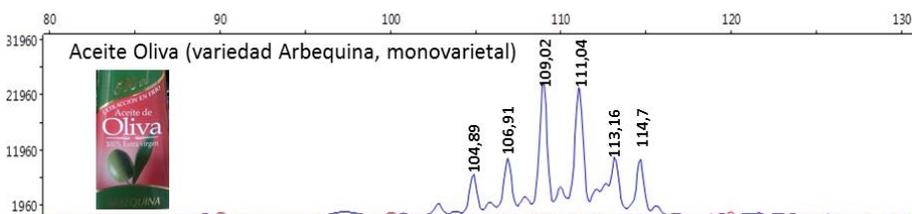
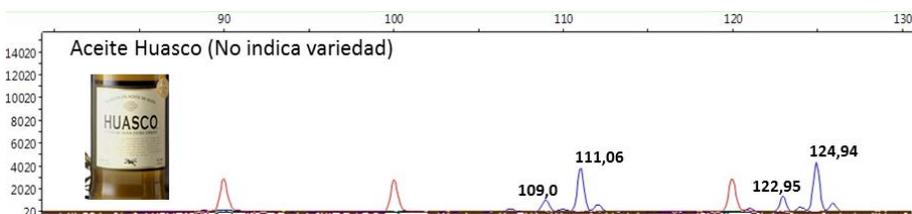
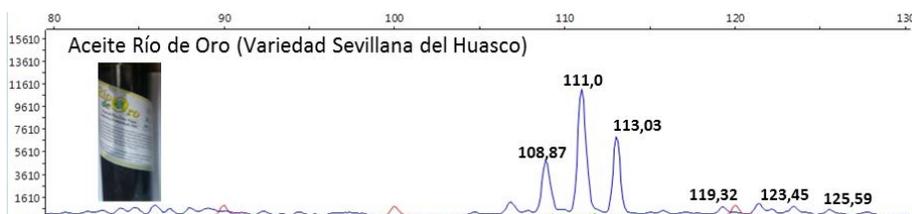
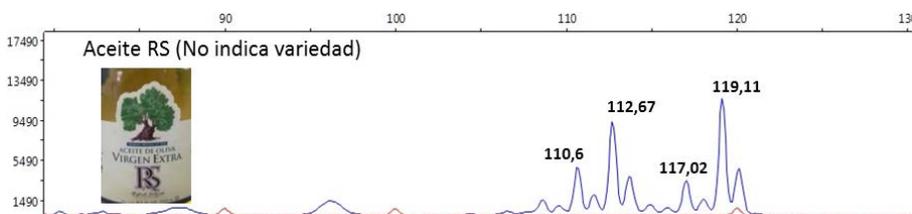
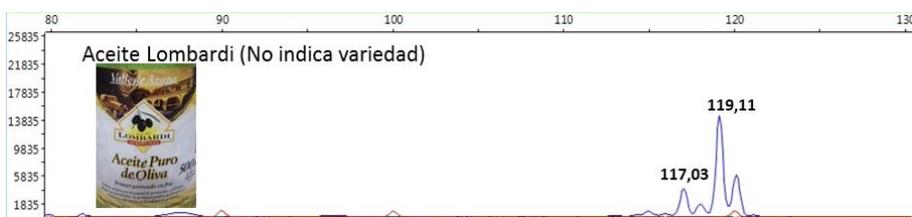
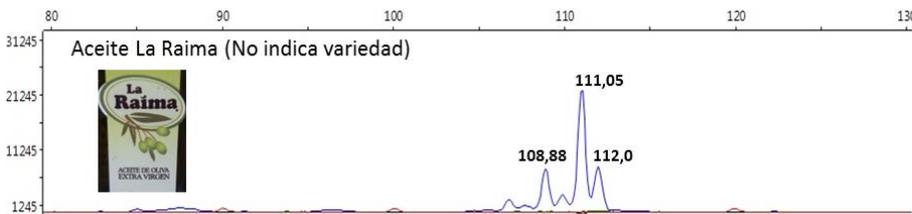
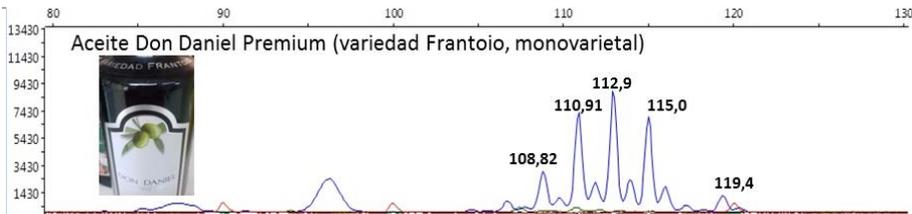
| Nombre | Producto |
|---|--|
| ADN molde o ADN templado de olivo, de calidad >1,6 de relación A_{260}/A_{280} y >1,5 de relación A_{260}/A_{230} | |
| SapphireAmp, Master Mix 2X (Takara). | |
| UDO99-011-F (primers Forward con fluorescencia) | |
| UDO99-011-R (primers Reverse sin fluorescencia) | |
| DCA18-F (primers Forward con fluorescencia) | |
| DCA18-1F-R (primers Reverse sin fluorescencia) Este primer fue diseñado por nosotros a partir de la secuencia N°accesion AJ279867, con el fin de disminuir el tamaño del producto de PCR que flanquea el microsatélite. | |
| GAPU82-F (primers Forward con fluorescencia) | |
| GAPU82-R (primers Reverse sin fluorescencia) | |
| DCA8-F (primers Forward con fluorescencia) | Se recomienda no utilizar , debido a que este SSR no discrimina entre variedades de olivo |
| DCA8-R (primers Reverse sin fluorescencia). Este primer fue diseñado por nosotros a partir de la secuencia N°accesion AJ279858, con el fin de disminuir el tamaño del producto de PCR que flanquea el microsatélite. | Se recomienda no utilizar , debido a que este SSR no discrimina entre variedades de olivo |

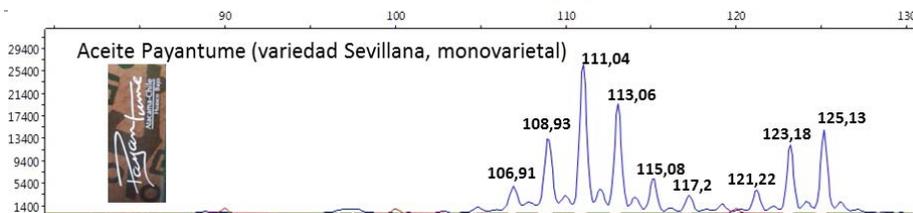
Los resultados se pueden observar en los ítems 4.9.1 y 4.9.2 y explicado en las Figuras 25, 26 y 27.

4.9.1.-Análisis de fragmento de 21 marcas de aceite de oliva extra virgen con marcador molecular SSR UDO99-011. Los gráficos muestran Señal de intensidad (eje Y) vs Pares de bases (eje x).

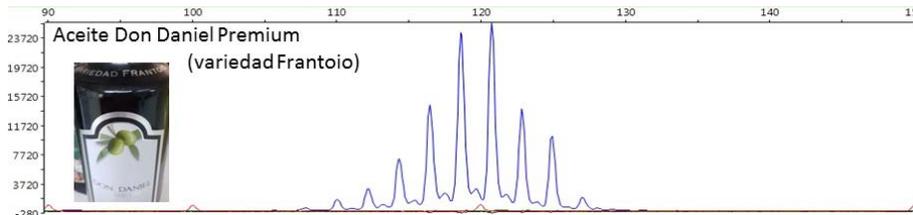
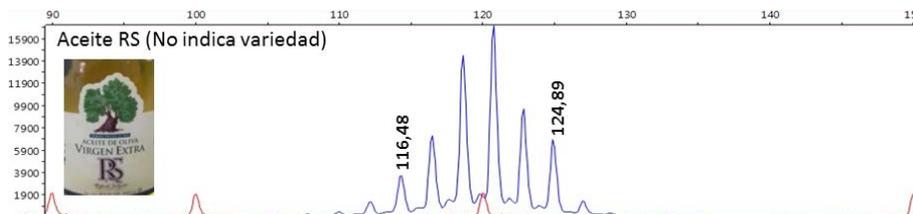
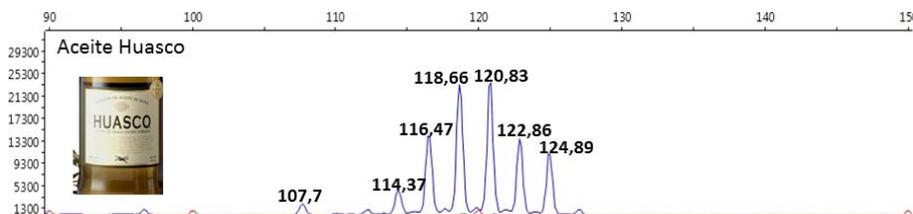
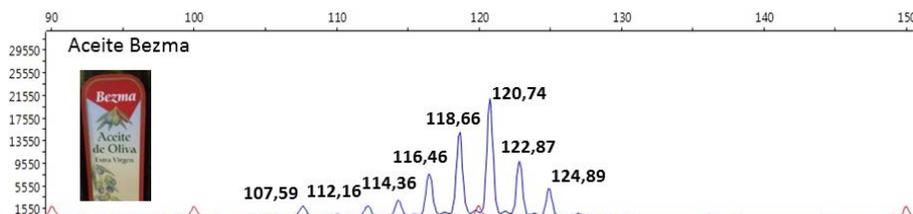
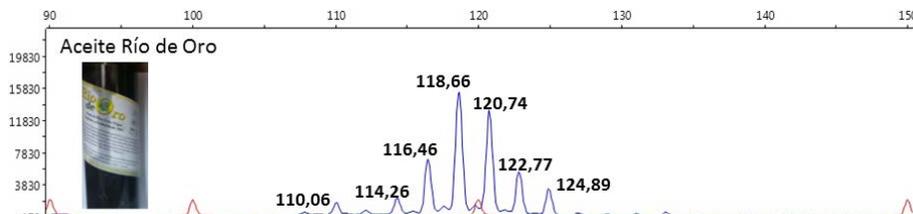


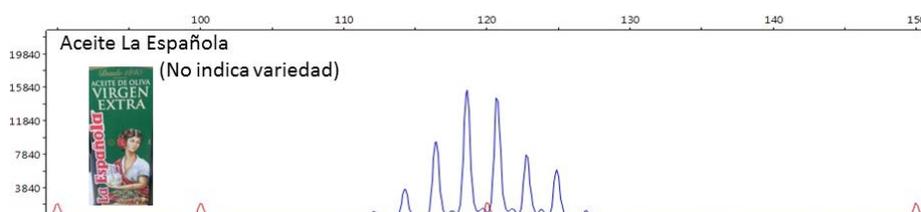
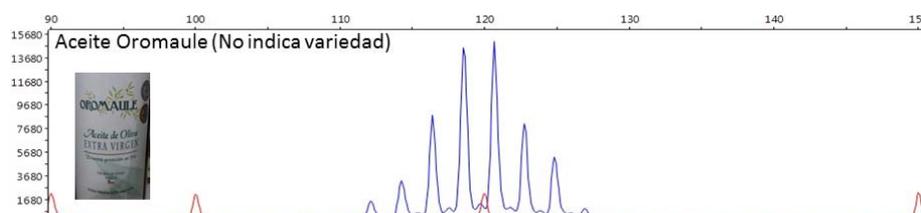
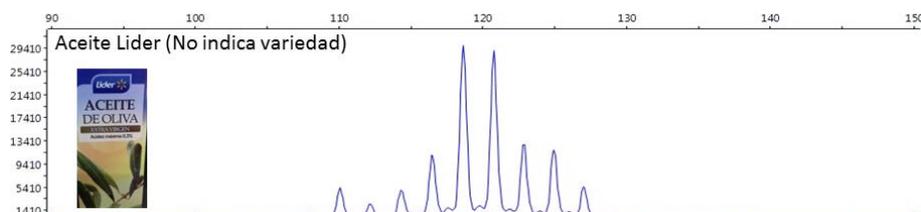
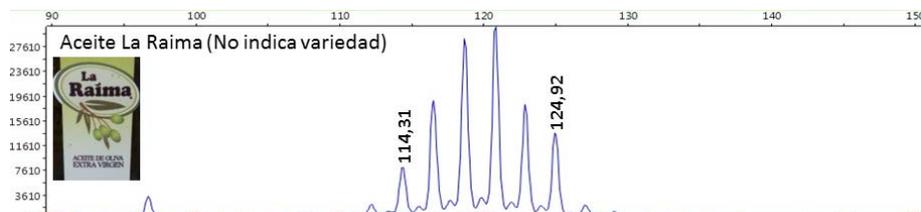
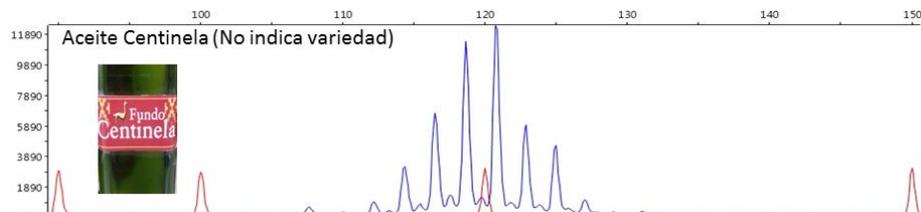
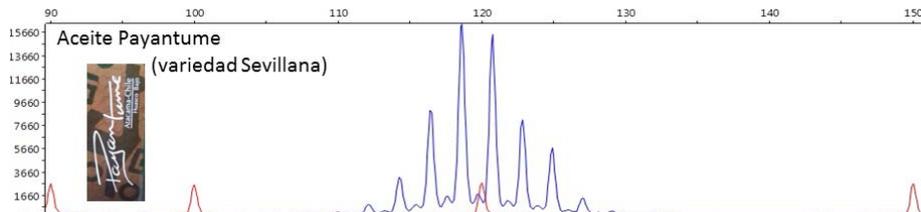
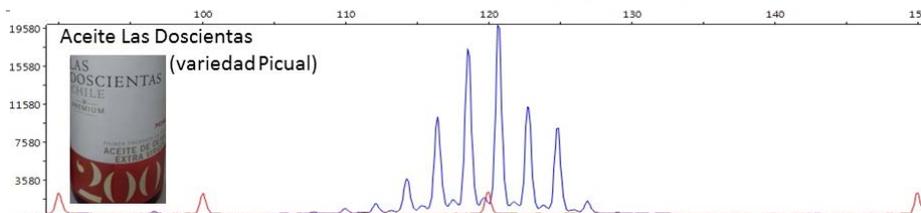


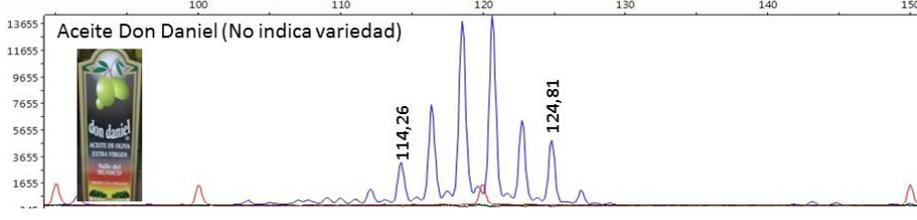
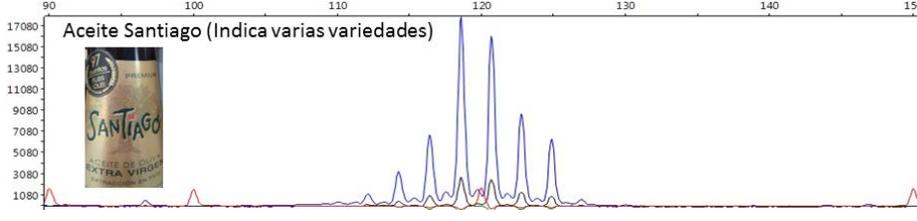
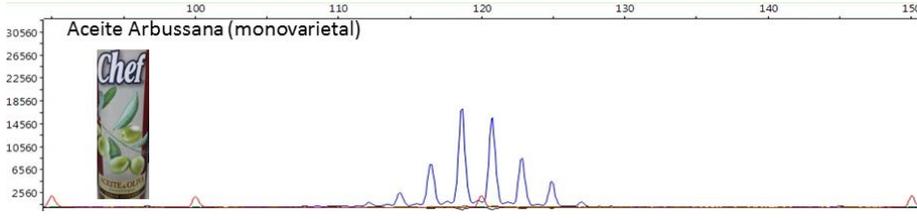
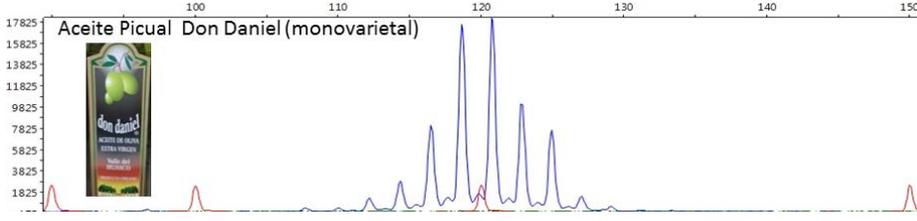
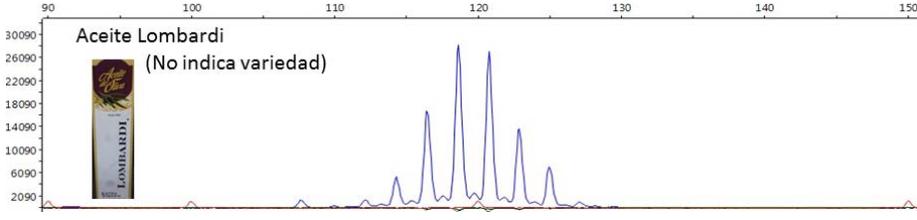
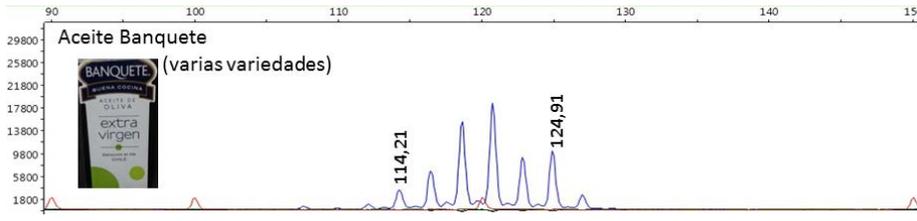
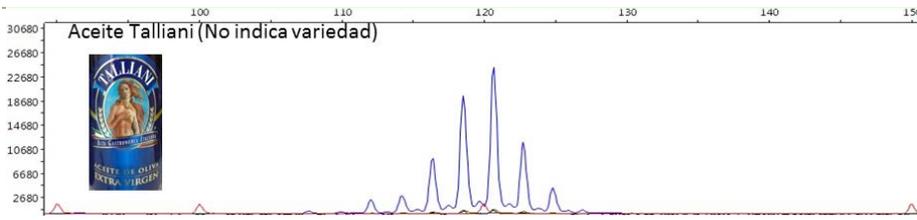


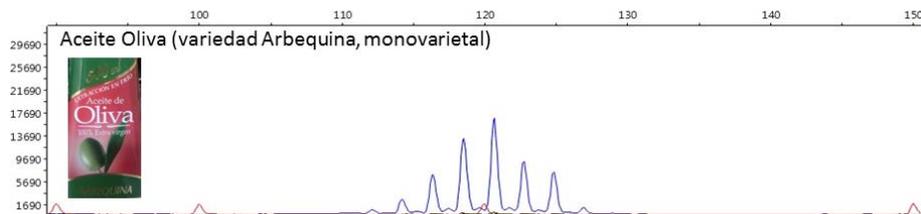
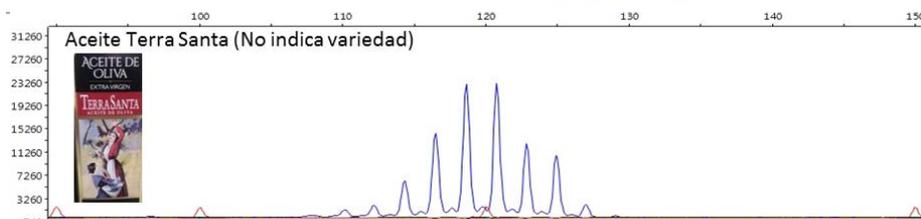


4.9.2.-Análisis de fragmento de 21 marcas de aceite de oliva extra virgen con marcador molecular SSR DCA8. Los gráficos muestran Señal de intensidad (eje Y) vs Pares de bases (eje x).









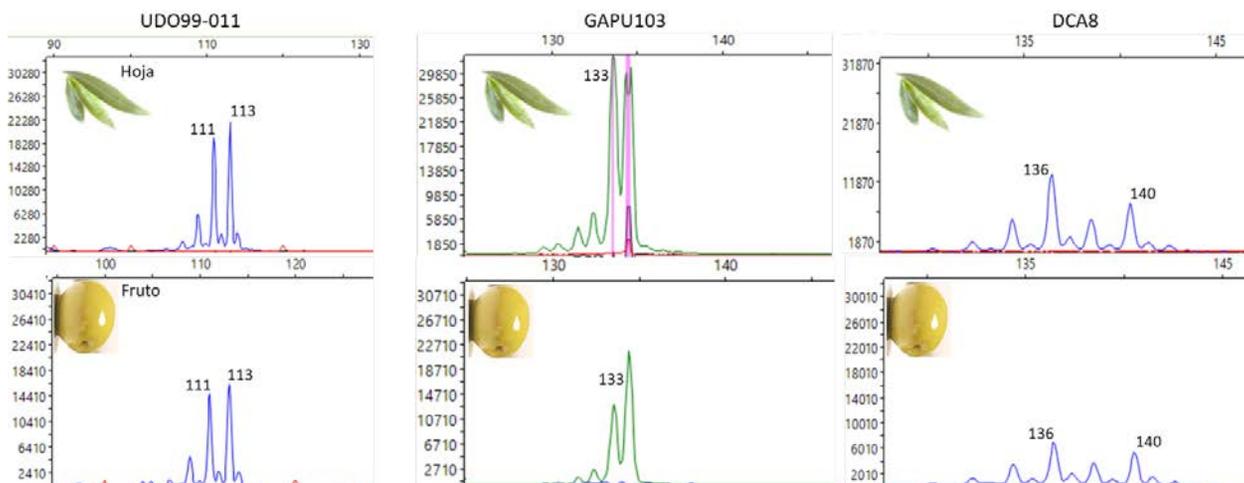
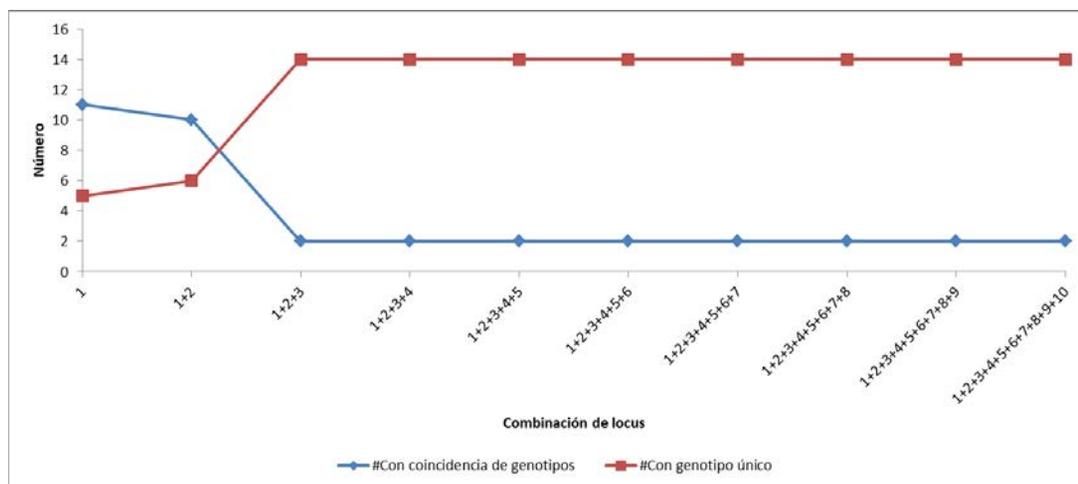


Figura 25: Número de locus necesarios para distinguir entre la Sevillana del Huasco (Azapa) y otras 14 variedades de oliva establecidas en Chile. Electroferograma de hojas de la variedad Sevillana del Huasco y su similitud con electroferograma de aceitunas de la misma variedad.

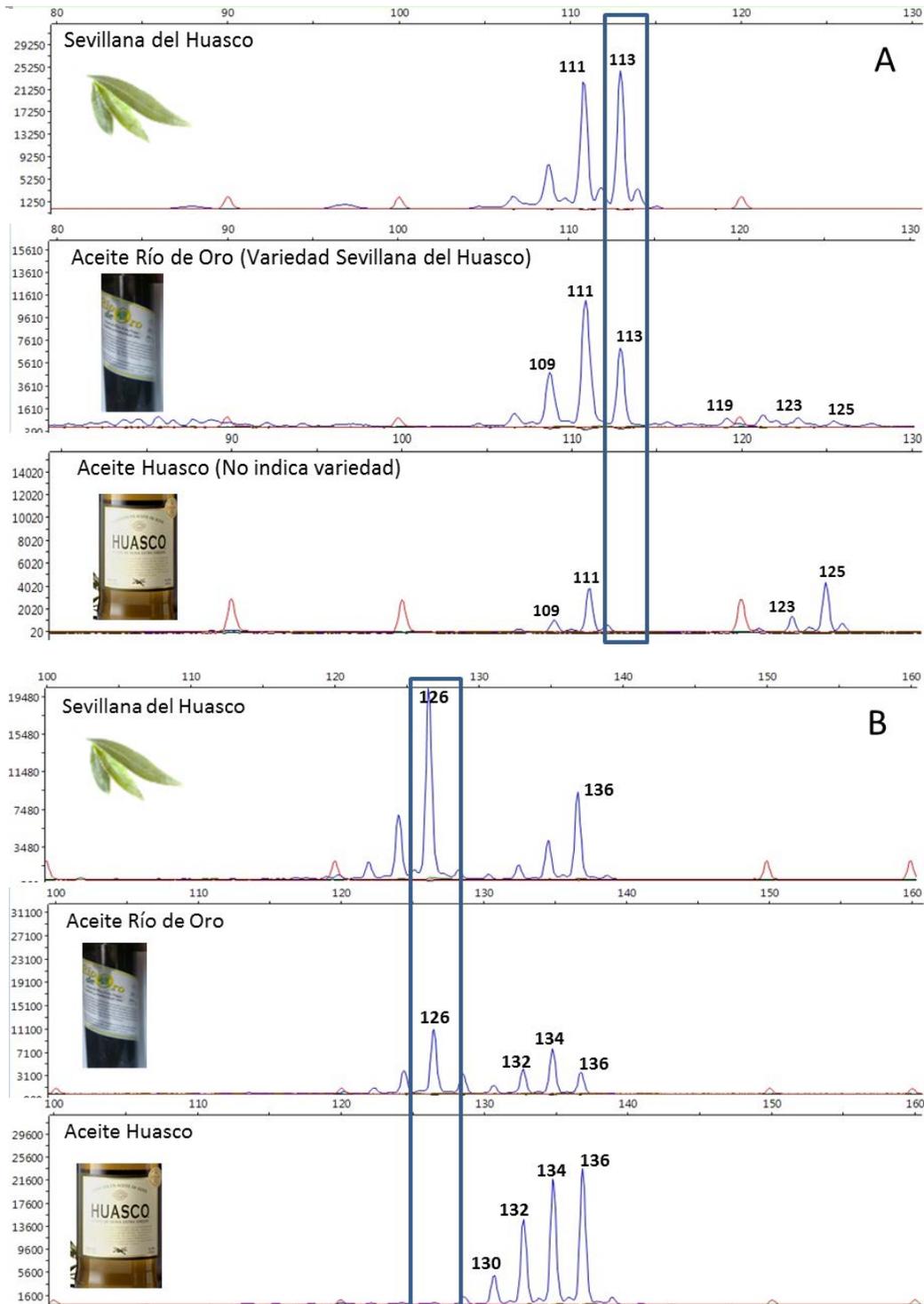


Figura 26: Electroferograma de productos de PCR obtenido de ADN de hoja de Sevilla del Huasco, ADN de aceite de oliva de la marca “Río de Oro” (producido por uno de los socios de la Asociación de Olivicultores del Huasco) y ADN de aceite de oliva de la marca “Huasco”, analizado con dos marcadores SSR, el marcador UDO99-011 (A) y el marcador DCA18 (B).

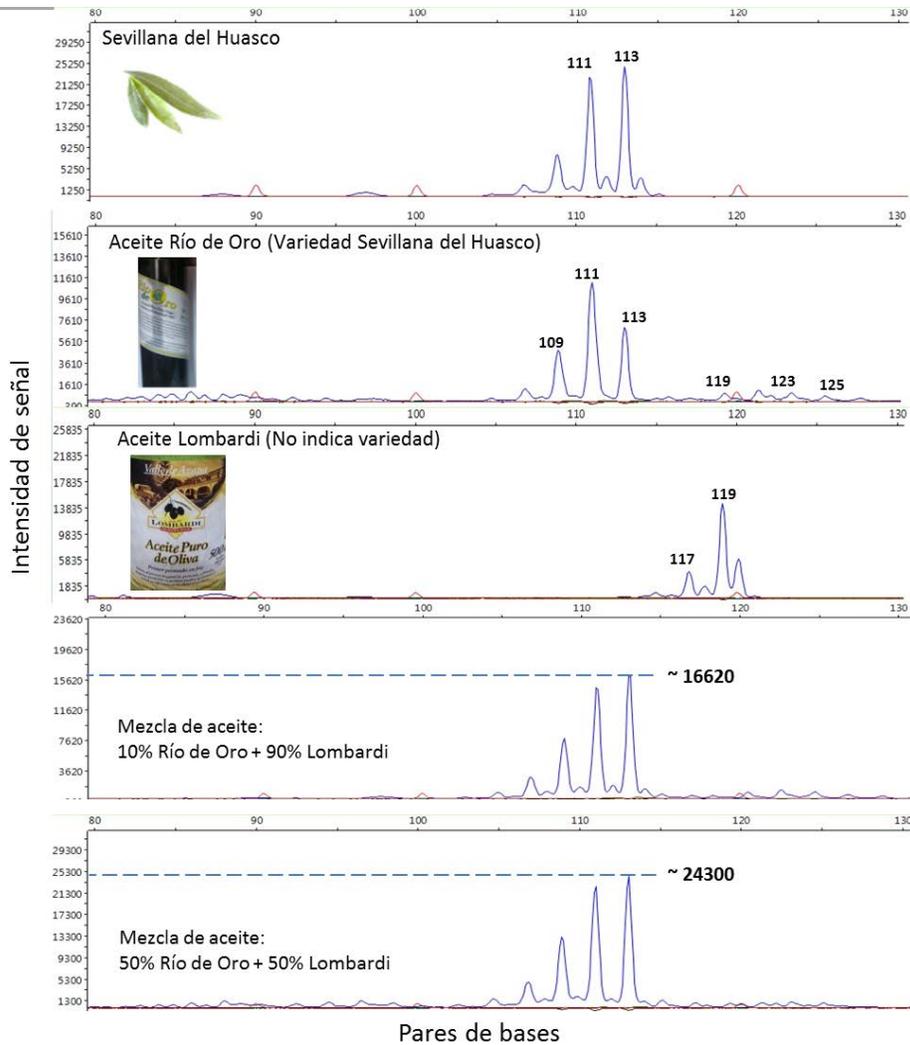


Figura 27: Se evaluó el límite de detección del método de análisis de fragmento usando ADN de aceite de Oliva con la variedad Sevillana del Huasco y el marcador UDO99-011. Uno de los aceites, marca “Río de Oro”, es elaborado con la Sevillana del Huasco, debido a que presenta los dos alelos, 111 y 113, mientras que otro aceite de oliva marca “Lombardi” presenta los alelos (117 y 119) de otra variedad. A partir de estos dos diferentes aceites realizamos mezclas, uno con 10% de aceite Río de Oro y 90% de aceite Lombardi, y otro de 50% de aceite de Río de Oro y 50% de Lombardi. Los resultados demostraron que la variedad Sevillana se puede detectar a un 10%, sin embargo, creemos que por la alta señal de intensidad se podría detectar incluso menor al 10%.

4.10.-Kit de identificación genética de frutos y harina de chañar

El kit de identificación genética de frutos y harina de chañar consta de dos métodos: el primero se trata sobre la extracción de ADN del tejido, en este caso de tejido de fruto y/o harina, descrito en el ítem 3.5.1, y el segundo método se trata sobre la identificación de aquellos productos de chañar, usando la reacción en cadena de las polimerasas (PCR), la preparación de esta reacción se describe en el ítem 3.5.3. Los productos usados para la identificación genética de los alimentos a base de chañar se describen a continuación:

Tabla 20: Productos utilizados para el kit de identificación genética de alimentos a base de chañar

| Nombre | Producto |
|--|----------|
| ADN molde o ADN templado de chañar, de calidad >1,6 de relación A_{260}/A_{280} y >1,4 de relación A_{260}/A_{230} | |
| SapphireAmp, Master Mix 2X (Takara). | |
| A104-F (primers Forward con fluorescencia) | |
| A104-R (primers Reverse sin fluorescencia) | |
| A149-F (primers Forward con fluorescencia) | |
| A149-R (primers Reverse sin fluorescencia) | |
| B284-F (primers Forward con fluorescencia) | |
| B284-R (primers Reverse sin fluorescencia) | |
| G021-F (primers Forward con fluorescencia) | |
| G021-R (primers Reverse sin fluorescencia) | |
| B264-F (primers Forward con fluorescencia) | |
| B264-R (primers Reverse sin fluorescencia) | |

4.10.1.-Análisis de fragmento de productos de PCR a partir de cinco harinas de chañar (Azapa, Pachica, San Pedro, Calama y Copiapó) con cinco marcadores moleculares SSR (SSR-Gsp.B264, SSR-Gd021, SSR-Gd284, SSR-Gsp.A104 y SSR-Gsp.A149)

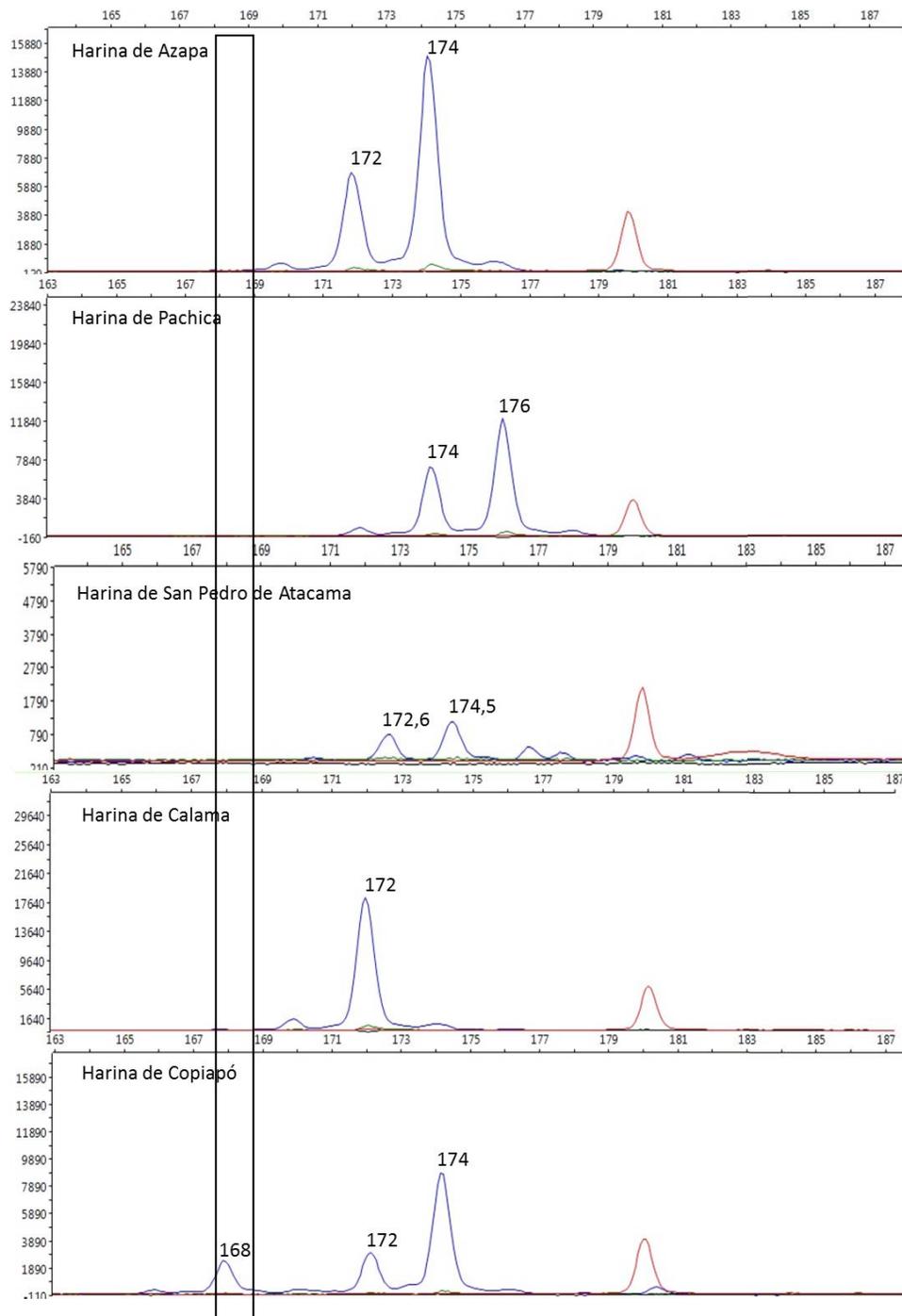


Figura 28. Caracterización genética de harina de chañar de cinco localidades o zona geográfica del norte de Chile con el marcador SSR-Gsp.B264.

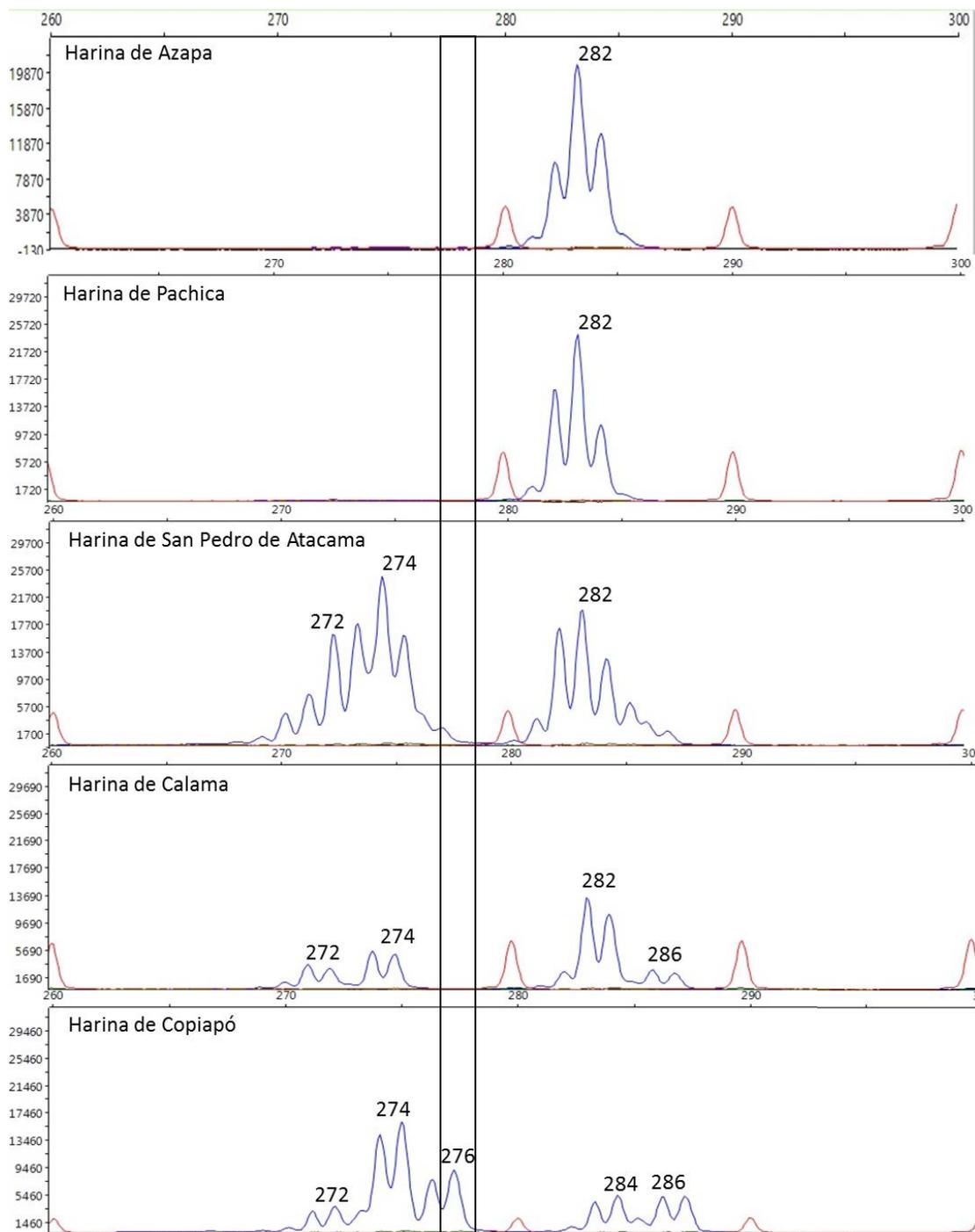


Figura 29. Caracterización genética de harina de chañar de cinco localidades o zona geográfica del norte de Chile con el marcador SSR-Gd021

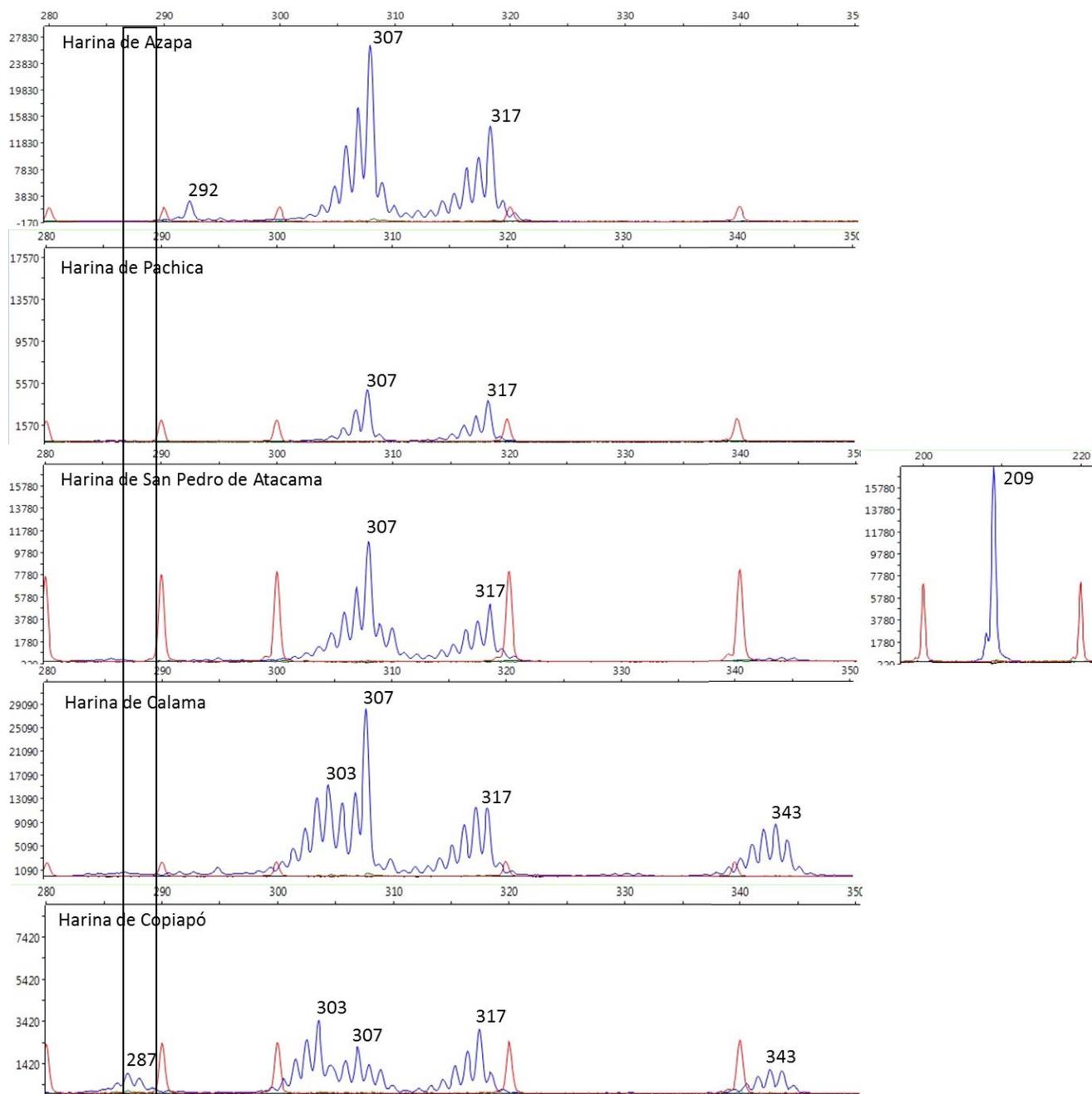


Figura 30. Caracterización genética de harina de chañar de cinco localidades o zona geográfica del norte de Chile con el marcador SSR Gd284

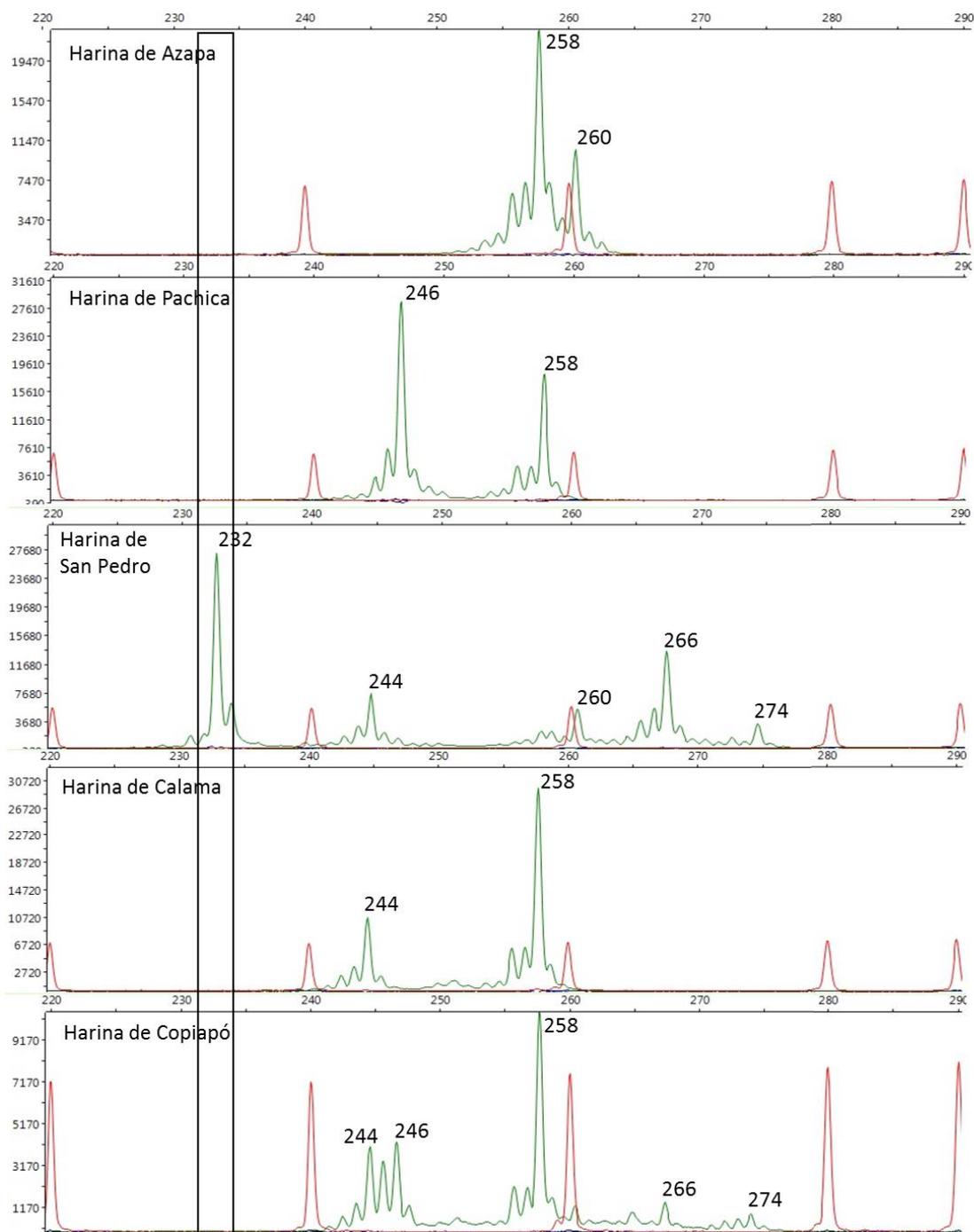


Figura 31. Caracterización genética de harina de chañar de cinco localidades o zona geográfica del norte de Chile con el marcador SSR-Gsp.A104.

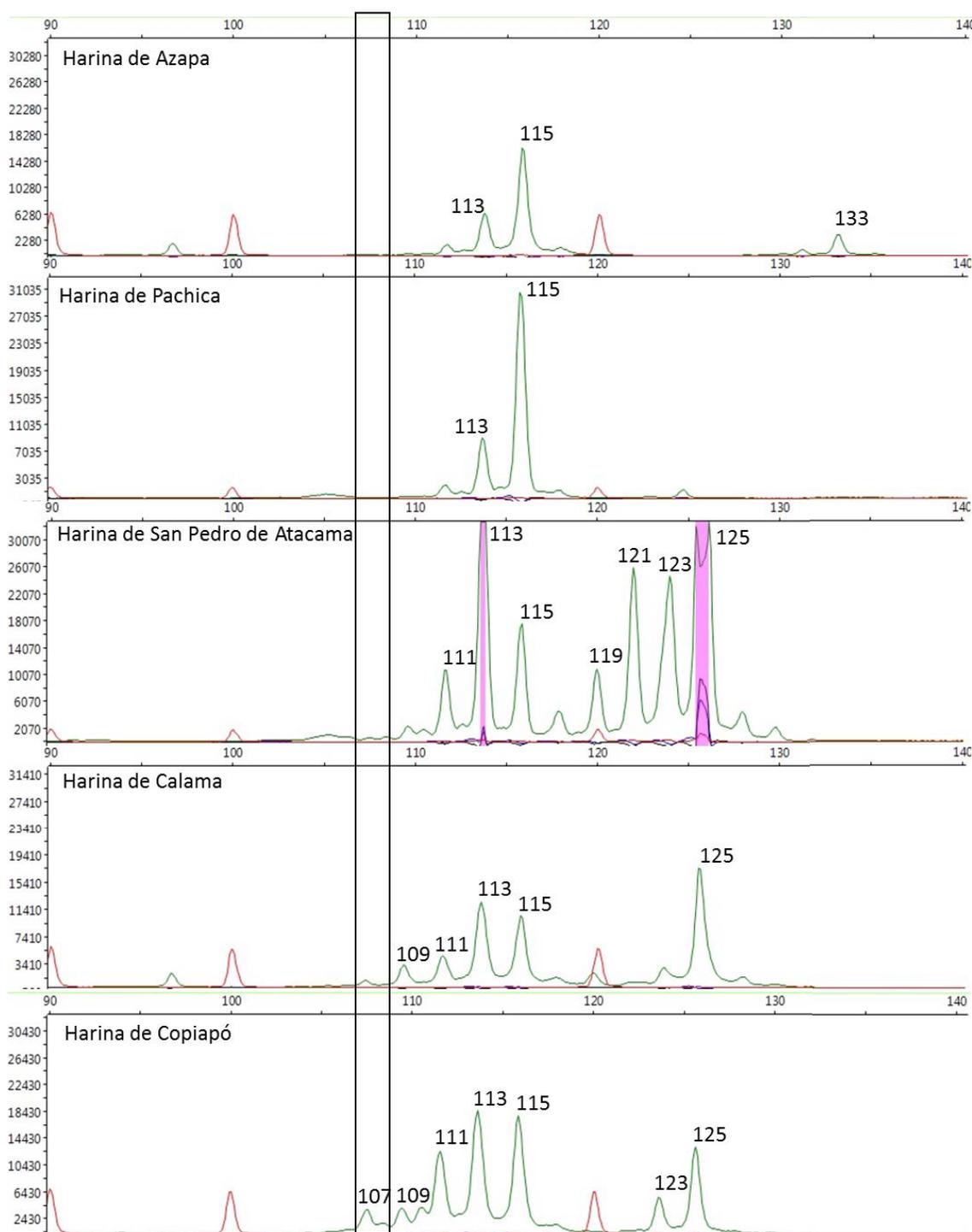


Figura 32. Caracterización genética de harina de chañar de cinco localidades o zona geográfica del norte de Chile con el marcador SSR-Gsp.A149.



Si bien es cierto, no fue posible identificar arropes de chañar de acuerdo a su zona geográfica, debido a que los SSR no se pueden amplificar a partir de ADN de arropes de chañar, al menos sí se identificó la especie en el arropes, a través de regiones de cloroplasto que son más estables que otras secuencias de ADN. Esto ayudará a determinar si el producto (arropes) realmente se elaboró con frutos de chañar. Sin embargo, uno de los productos de chañar que fue posible realizar caracterización genética y distinguir entre localidades, fue la harina de chañar. En la Figura 28, se puede observar con el marcador SSR-Gsp.B264 un alelo exclusivo de 168 pb encontrado en la harina de chañar de Copiapó, el cual no es observado en las harinas de chañar de Azapa, Pachica, Calama y San Pedro de Atacama. Lo mismo ocurre al observar en la Figura 29, con el marcador SSR-Gsp.021, un alelo exclusivo de 276 pb; en la Figura 30, con el marcador SSR-Gsp.Gd284, un alelo exclusivo de 287 pb; y en la Figura 32, con el marcador SSR-Gsp.A149, un alelo exclusivo de 107 pb. Se destaca también que sólo en la harina de San Pedro de Atacama se puede observar un alelo exclusivo de 232 pb (Figura 31) con el marcador SSR-Gsp.A104 y un alelo exclusivo de 209 pb (Figura 30) con el marcador SSR-Gd284. Estos polimorfismos observados con marcadores SSR en frutos de chañar pueden indudablemente apoyar una justificación para solicitar la Denominación de Origen de la harina y arropes de chañar. Cabe destacar que el fruto es la materia prima para elaborar dichos alimentos y que se logró diferenciar mediante caracterización genética. Además, estos datos moleculares se correlacionan con los alelos que hemos observado en los árboles de chañar de cada localidad o región, usando los mismos marcadores SSR (Figura 23, 24, 25, 26 y 27).

4.11.-Publicaciones científicas sometidas en revistas indexadas.

Hasta el momento se han elaborado tres publicaciones científicas que fueron sometidas a revistas indexadas. Sin embargo, hemos procesado y analizado más datos para elaborar al menos dos publicaciones más. En el **ANEXO 5** se detallan las publicaciones científicas y el correo enviado por el editor de cada revista.



4.12.-Actividades de Difusión

Tabla 21: Resumen de actividades de difusión

| N° | Actividad | Lugar | Fecha |
|----|--|---|-------------------|
| 1 | Ceremonia de lanzamiento proyecto FIC | Salón Auditorio de Minas | 13/09/2016 |
| 2 | Reunión con Asociación de Olivicultores del Huasco | En predio del Sr. Vicente Rodríguez | 05/12/2016 |
| 3 | Taller de avance de resultados | En Campus Costanera, Sede Vallenar-UDA | 25/01/2017 |
| 4 | Congreso Internacional IUFRO | En Hotel Sonesta. Evento organizado por la agrupación internacional IUFRO y la Universidad de Concepción | 04 al 09/07/2017 |
| 5 | Radio UDA | Radio UDA. El objetivo fue informar los objetivos del proyecto junto con una de las beneficiarias, Sra. Elena Molina. Se encuentra disponible el audio. | 18/07/2017 |
| 6 | Reunión con arropas de Chañar | Se aprovechó el encuentro del Taller de Chañar convocado por Asesorías Mandujo y financiado por el GORE de Atacama, para reunirnos con las arropas de chañar. | 30/08/2017 |
| 7 | Radio Madero | Radio Madero. El objetivo fue informar los avances del proyecto junto con una de las beneficiarias, Sra. Elena Molina. Se encuentra disponible el audio. | 27/09/2017 |
| 8 | Seminario Chañar INFOR | En Salón Edificio MOP. Seminario sobre Chañar organizado por INFOR, ver programa adjunto. | 30/09/2017 |
| 9 | Curso de Genética para beneficiarios no directos | Curso realizado para 20 alumnos y 10 profesores de colegios de las Provincias de Copiapó y Chañaral. | 12 y 19/10/2017 |
| 10 | Ceremonia de cierre de proyecto | Hotel Atacama Suites | Fecha por definir |



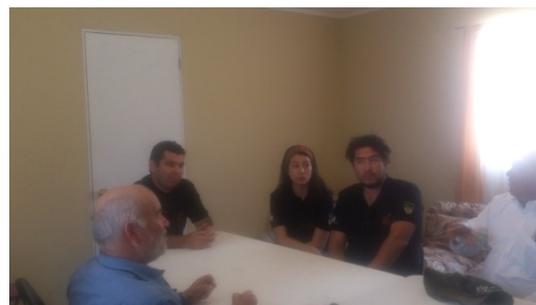
UNIVERSIDAD DE ATACAMA



Actividad N°1: Ceremonia de lanzamiento proyecto FIC “ADN Vegetal de Atacama”.



Actividad N°2: Reunión con directiva de la Asociación de Olivicultores del Huasco.



Tema del día



PRODUCTORES OLIVÍCOLAS DEL VALLE DEL HUASCO ESTÁN EN PROCESO DE CERTIFICACIÓN DE DENOMINACIÓN DE ORIGEN DEL ACEITE DE OLIVA EXTRA VIRGEN.

Estudian las diferencias genéticas de la aceituna sevillana del Huasco

Redacción
cronica@diarioatacama.cl

Encantarse con el aceite de oliva, degustar aceitunas sevillanas o conocer los campos de olivos se han transformado en una de las actividades obligadas de realizar para quienes visitan el Valle del Huasco. El clima privilegiado, además de las excelentes condiciones de suelo y agua, proporcionan un ambiente ideal para lograr un producto único, desarrollado a través de un sistema de cultivo tradicional, trasgado de generación en generación.

En este escenario y ante la necesidad de los olivicultores de diferenciar su variedad y destacar sus especiales características, la Universidad de Atacama, a través del doctor en biología Roberto Contreras, ingeniero agrónomo e investigador del Centro Regional de Investigación y Desarrollo Sustentable de Atacama, Cridesat-UDA, comenzó un importante estudio que busca establecer las diferencias genéticas de individuos de distinta procedencia de la variedad "Sevillana" con respecto a otras variedades comercializadas en Chile.

"En Chile no es común usar la trazabilidad genética en productos elaborados a base de materia primas vegetales".

Roberto Contreras
Doctor en Biología

Según explicó el doctor Contreras, "esto permitirá identificar de forma certera tanto al vegetal como al producto procesado, respaldando la procedencia del producto. Todo gracias a un método simple y certero que identificará de manera precisa el producto comercial de la aceituna del Huasco".

DENOMINACIÓN DE ORIGEN

Hoy, los productores olivícolas del Valle del Huasco están en proceso de certificación de denominación de origen del aceite de oliva extra virgen y de la aceituna sajada de mesa. En este contexto, varias son las instituciones que, desde distintas veredas, han aportado con sus estudios, proyectos e investigaciones.

Según el programa "Sello

UDA. Al estudio realizado durante el año 2015, se suman aportes del Gobierno Regional de Atacama, a través de recursos del Fondo de Innovación para la Competitividad, FIC-2016, los que serán ejecutados durante este año.

de Origen", dependiente del Ministerio de Economía, el Valle del Huasco es la cuna del famoso aceite de oliva único por sus características organolépticas, expresadas en su alto contenido de ácido oleico, polifenoles y con buenas características nutraceuticas. Este pro-

grama indica que el producto debe ser necesariamente extra virgen y extraído sólo por medios físicos; asimismo, una de las variedades de aceituna incluida para su producción es la "Sevillana", especie que ha sido plantada en la zona desde los tiempos de la Conquista.

Por su parte, el Centro Experimental Huasco del Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA), desde el 2012, apoya el proceso de denominación de origen de la aceituna de mesa sajada (salmuera), a más de 350 olivicultores del Huasco, incorporando técnicas para aumentar la durabilidad, mejorar la elaboración del método tradicional y estandarizar sus características para su comercialización.

Para fundamentar la denominación de origen del aceite de oliva y la aceituna de mesa del Huasco, los productores olivícolas solicitaron el registro al Instituto Nacional de Propiedad Industrial, INAPI, organismo encargado de la administración y atención de los servicios de la propiedad industrial en Chile, basados en la procedencia geográfica del producto, utilización de métodos de elaboración tradicional y la materia prima: la variedad de aceituna "Sevillana".

KIT DE IDENTIFICACIÓN GENÉTICA

Con el objetivo de atender las necesidades de productores y consumidores, además de impulsar la investigación, desa-

rollo e innovación, I+D+i, en el sector productivo agrícola regional, durante el año 2015 el Cridesat-UDA postuló al Fondo de Innovación para la Competitividad, FIC, del Gobierno de Atacama, adjudicándose cerca de 97 millones de pesos para la implementación del proyecto "Desarrollo de un kit de identificación genética para apoyar la Denominación de Origen de Productos elaborados de aceituna Sevillana del Huasco y Chañar de Atacama. (ADN vegetal de Atacama)".

"Este proyecto busca desarrollar una metodología para caracterizar todo producto elaborado al Chañar, asociado a Valle de Copiapó, y todo producto elaborado de la Sevillana del Huasco, al Valle del Huasco", indica el dr. Osvaldo Pavéz, director del Cridesat-UDA.

"En Chile no es común usar la trazabilidad genética en productos elaborados a base de materia primas vegetales. Por eso, la idea de desarrollar metodologías para la identificación de plantas y productos elaborados son importantes para una mejor tipificación. Con estas técnicas se puede desarrollar un kit para el control de trazabilidad genética, sien-



UNIVERSIDAD DE ATACAMA



350 olivicultores

fueron apoyados en la denominación de origen de la aceituna de mesa sajadá (salmuera).

97 millones

de pesos se adjudicó Cridesat-UDA a través de un Fondo de Innovación para la Competitividad, FIC el 2015.



EN MAYO SE REALIZARÁ UN ESTUDIO EN HUASCO.



EL ESTUDIO GENÉTICO BUSCA MEJORAR LA PRODUCTIVIDAD.



LA UNIVERSIDAD DE ATACAMA APOYARÁ LA INVESTIGACIÓN DE LAS ACEITUNAS CON PROFESIONALES ESPECIALISTAS.

do efectivas, accesible y replicable a un bajo costo", explica Contreras.

Durante la investigación, que se comenzará en mayo de este año, se realizará un estudio de la variedad de Olivo Sevillana del Huasco y un estudio del Chañar. Se evaluará con varios marcadores de ADN la diferencia de origen entre los ecotipos de Sevillana y, por otro lado, de Chañar de Atacama con otras variedades regionales. Finalmente, se realizará un kit de identificación, simplificando el proceso de detección, seleccionando sólo los mejores marcadores de ADN.

"El estudio podría dar un impulso a la producción tanto

del chañar como de aceituna sajadá y aceite oliva de Sevillana del Huasco. Es por ello que la Universidad de Atacama apoyará esta investigación con profesionales especialistas, laboratorios, equipamiento de biología molecular e instrumentos. La precisión de las técnicas genéticas que se utilizarán en este proyecto es similar a lo realizado en el área forense humana; si bien en un principio la investigación requerirá más tiempo e insumos, al final se obtendrá un método de diagnóstico simplificado, que podrá ser aplicado por cualquier institución o empresa interesada", concluye el director de Cridesat-UDA.

Análisis molecular

• Para el doctor Contreras, "el proceso de denominación de origen se puede apoyar adicionalmente con un estudio genético que asocie el aceite de oliva del Huasco con su zona geográfica; así se asegura la presencia de la variedad sevillana en el producto".

• "La adaptación de esta variedad por más de 500 años en la zona del Huasco habría permitido cambios genéticos significativos en el genoma, siendo éste un periodo suficiente para originar dichas modificaciones genéticas. Estos cambios genéticos son polimorfismos ubicados en zonas codificantes y no codificantes del ADN nuclear, mitocondrial o del cloroplasto, siendo estos cambios de mucho interés para estudios de identificación de una variedad en particular. Sobre todo cuando esta variedad vegetal tiene un interés comercial", explicó Contreras.



EL TRANSPORTE LONGITUDINAL VOLVERÁ A RODRÍGUEZ.

Transporte público retornará a calle Rodríguez a contar del lunes

COPIAPÓ. Existirá una marcha blanca hoy y hasta mañana.

A contar del lunes y de manera oficial todas las líneas de colectivos y micros que estaban transitando por Los Carreras -entre Henríquez y Circunvalación-, retornarán a su recorrido habitual por calle Rodríguez. Así lo informó la seremi de Transportes y Telecomunicaciones de Atacama, Ericka Portilla.

"A partir del lunes 07 de marzo el Transporte Público retoma su recorrido habitual a calle Rodríguez, y durante este fin de semana, sábado 05 y domingo 06, va a existir una marcha blanca con el propósito de que todos ellos estén enterados durante estos dos días, puedan reincorporarse y, que la comunidad también se acostumbre nuevamente, a que va a encontrar sus colectivos y sus micros pasando por Rodríguez, ya formal y masivamente a partir de este lunes 07 de marzo", aseguró la seremi.

De este modo, todo el transporte longitudinal, las líneas 1, 11, 4, 5, 6, 66, 07, 7, 077 y 77 van a estar transitando por Rodríguez. Así es que la comunidad va a poder ahí tomar su transporte público y, también por supuesto, algunos letrenos del transporte mayor, de las micros Sol de Atacama, que re-

corren actualmente por Los Carrera ya a partir del lunes, retornan a calle Rodríguez", detalló Portilla Barrios.

Cabe recordar que, las líneas longitudinales de taxis colectivos y algunos de los recorridos que realizan los buses de Sol de Atacama, comenzaron a circular de manera transitoria por Los Carrera a comienzo de noviembre, a raíz de los trabajos de reposición y conservación vial que inició el Gobierno a través de Minvu en calle Rodríguez, entre otras vías que se vieron fuertemente afectadas por el paso de los aluviones de marzo de 2015, y que significó el cierre temporal de esta importante calle de Copiapó.

En este sentido, la seremi expresó su alegría por la habilitación de calle Rodríguez y el retorno de la locomoción pública a esta vía. "Estamos muy contentos que el transporte público retome Rodríguez porque es una vía con una buena capacidad, los tiempos de los semáforos están ajustados al transporte público y porque lo van a hacer en una vía nueva, en buenas condiciones, resultado de que el Gobierno reconstruyó este eje tan importante de la ciudad de Copiapó", concluyó.

ESPECIAL

ENANITOS VERDES

TITO DAVILA (EX ENANITOS VERDES - ANDRÉS CALAMARÓ)
 KIUGE HAYASHIDA (GUITARRISTA DE CHARLY GARCÍA)
 TOÑO SILVA (BATERISTA DE CHARLY GARCÍA)
 JAVIER HENRÍQUEZ (EX VALIJA DIPLOMÁTICA)

EVENTO GRATUITO POR EL PAGO DE TU ENTRADA A SALSA DE JUEGOS

SÁBADO 05 MARZO



UNIVERSIDAD
DE ATACAMA



CONSORCIO DE UNIVERSIDADES
DEL ESTADO DE CHILE



INICIO ACERCA DE NOTICIAS UNIVERSIDADES CENTRO DE DOCUMENTACIÓN
PUBLICACIONES PROYECTOS Y REDES CONTACTO

A través del Centro Regional de Investigación y Desarrollo Sustentable de Atacama, CRIDESAT-UDA
Investigación de la UDA estudia las diferencias genéticas de la aceituna sevillana del Huasco

Palabras clave: Alimentación CRIDESAT I+D+i U. de Atacama UDA



Con el objetivo de atender las necesidades de productores y consumidores, además de desarrollar investigación, desarrollo e innovación, I+D+i, en sector productivo agrícola regional, durante el año 2015 el CRIDESAT-UDA postuló al Fondo de Innovación para la Competitividad, FIC, del Gobierno de Atacama, adjudicándose cerca de 97 millones de pesos para la implementación del proyecto "Desarrollo de un kit de identificación genética para apoyar la Denominación de Origen de Productos elaborados de aceituna Sevillana del Huasco y Chañar de Atacama. (ADN vegetal de Atacama)".



Fuente: UDA

"Este proyecto busca desarrollar una metodología para caracterizar todo producto elaborado en base al Chañar, asociado a Valle de Copiapó, y todo producto elaborado en base a la aceituna Sevillana del Huasco, al Valle del Huasco", indica el Dr. Osvaldo Pavez, director del CRIDESAT-UDA.

07.03.2016. Huaseo. Encantarse con el aceite de oliva, degustar aceitunas Sevillanas o conocer los campos de olivos se han transformado en una de las actividades obligadas de realizar para quienes visitan el Valle del Huasco. El clima privilegiado, además de las excelentes condiciones de suelo y agua, proporcionan un ambiente ideal para lograr un producto único, desarrollado a través de un sistema de cultivo tradicional, traspasado de generación en generación.

En este escenario y ante la necesidad de los olivicultores de diferenciar su variedad y destacar sus especiales características, la Universidad de Atacama, a través del Doctor en biología Roberto Contreras, ingeniero agrónomo e investigador del Centro Regional de Investigación y Desarrollo Sustentable de Atacama, CRIDESAT-UDA, comenzó un importante estudio que busca establecer las diferencias genéticas de individuos de distinta procedencia de la variedad "Sevillana" con respecto a otras variedades comercializadas en Chile.

Según explica el Dr. Contreras, "esto permitirá identificar de forma certera tanto al vegetal como al producto procesado, respaldando la procedencia del producto. Todo gracias a un método simple y certero que identificará de manera precisa el producto comercial de la aceituna del Huasco".

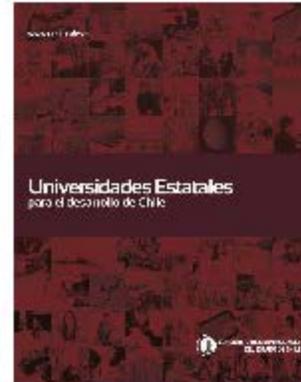
Denominación de origen

Hoy, los productores olivícolas del Valle del Huasco están en proceso de certificación de denominación de origen del aceite de oliva extra virgen y de la aceituna sajada de mesa. En este contexto, varias son las instituciones que, desde distintas veredas, han aportado con sus estudios, proyectos e investigaciones.

Según el programa "Sello de Origen", dependiente del Ministerio de Economía, el Valle del Huasco es la cuna del famoso aceite de oliva único por sus características organolépticas, expresadas en su alto contenido de ácido oleico, polifenoles y con buenas características nutracéuticas. Este programa indica que el producto debe ser necesariamente extra virgen y extraído sólo por medios físico; asimismo, una de las variedades de aceituna incluída para su producción es la "Sevillana", especie que ha sido plantada en la zona desde los tiempos de la Conquista.

Por su parte, el Centro Experimental Huasco del Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA), desde el 2012, apoya el proceso de denominación de origen de la aceituna de mesa sajada (salmuera), a más de 350 olivicultores del Huasco, incorporando técnicas para aumentar la durabilidad, mejorar la elaboración del método tradicional y estandarizar sus características para su comercialización.

A sí mismo, para fundamentar la denominación de origen del aceite de oliva y la aceituna de mesa del Huasco, los



Universidades Estatales para el desarrollo de Chile

Ver en línea | Descargar (PDF)

VIDEOS

Rector Alvaro Rojas en Panel Comisión de Educación del Senado. Jueves 05.05.2016

[Ver más...](#)

TEMAS PAÍS



Lanzan en Antofagasta libro sobre el aporte científico de Universidades del Estado

[Ver más...](#)

BOLETÍN UESTATALES.CL



Actividad N°3: Taller de avance de resultados

3/5/2018

Positivos avances presenta estudio molecular de la aceituna Sevillana del Huasco y sus derivados

El Tiempo en Atacama
Coplano
Chañaral
Vallenar
Ver mas [+]

Región de Atacama, Miércoles 29 de Marzo 2017 -

PORTADA CRÓNICA POLÍTICA POLICIAL DEPORTES ECONOMÍA OPINIÓN CHILE Y EL MUNDO CULTURA CUENTOS SUSCRIPCIONES CONTACTO

regional

Crónica
Publicado el 25/03/2017 03:54:00

Positivos avances presenta estudio molecular de la aceituna Sevillana del Huasco y sus derivados

Twitter Facebook

"A través del Proyecto FICADN Vegetal, hemos podido diferenciar, a través de marcadores moleculares SSR, la variedad ancestral del Huasco denominada Sevillana del resto de variedades de olivos producidos a nivel nacional. Estos análisis evidenciaron que los productores de la Asociación de Olivicultores AGA Huasco cultivan el mismo genotipo de árboles ancestrales del Huasco, biotipos locales únicos en Chile debido a su antigüedad y adaptación agroclimática al Valle", señala el Dr. Roberto Contreras, Ingeniero agrónomo, doctor en biología, investigador del Centro Regional de Investigación y Desarrollo Sustentable de Atacama, CRIDESAT, de la Universidad de Atacama y director del Proyecto FICADN Vegetal, financiado con recursos del Fondo de Innovación para la Competitividad, FIC, del Gobierno de Atacama.




Los datos fueron presentados a los integrantes y a la directiva de la Asociación Gremial de Agricultores de la Provincia del Huasco (AGA Huasco), principales interesados en contar con información que agregue valor a los productos elaborados con olivos de la variedad Sevillana del Huasco.

"Para nosotros es súper importante este proyecto, ya que nos entrega información sobre algo que para muchos es obvio, es decir, demostrar la diferencia que tienen nuestros productos respecto a los que proceden de otros Valles del país. Con este sistema tenemos una base científica y demostrable, una caracterización que podemos indicar en cualquier parte. Eso refuerza nuestra identidad, les da valor a nuestros productos, nos permite distinguir sus fortalezas respecto a los demás", señaló Hermann Von Mayenberger, presidente de la Asociación Gremial de Agricultores de la Provincia del Huasco (AGA Huasco).

Para Vicente Rodríguez, productor de aceite de oliva y aceitunas de mesa, "estos estudios son muy importantes porque son una forma de certificar que nuestro aceite tiene denominación de origen de aceituna Sevillana, producida en el Valle del Huasco. Hoy, que vemos los primeros resultados del Proyecto y las proyecciones que puede tener, puedo decir que puede ser de gran ayuda para los oliveros", indicó.

Durante la jornada se presentaron los avances obtenidos durante el desarrollo del Proyecto y se indicaron las acciones que aún quedan por concretar. Además, y de manera espontánea, surgieron nuevas propuestas por parte de los olivicultores.

En este sentido, Hermann Von Mayenberger señaló que "esperamos que el proyecto avance para contar con esa base científica y, por supuesto, esperamos seguir trabajando con los Investigadores de la Universidad de Atacama. Tenemos un importante campo de trabajo donde se pueden ampliar las propuestas; nosotros tenemos mucha experiencia que aportar y, al mismo tiempo, necesidades que cubrir, sobre todo en la diversificación para salir al mundo a entregar nuestros productos", explicó.

Finalmente, el Dr. Roberto Contreras señaló que "si bien aún nos quedan estudios por realizar, tras la jornada se presentaron nuevas ideas para avanzar en otros tipos de análisis o detecciones, por ejemplo, en las posibles mezclas de aceite que se ofrecen como "oliva" de manera fraudulenta. De esta manera el consumidor obtendrá un producto que es propio de la zona geográfica de origen, producido con olivos de Sevillana ancestral", concluye.

Portada del día
Warning: mysql_fetch_array(): sup
Warning: mysql_fetch_array(): sup
Portada

Lo más leído
En la semana
En el mes

27/03/2017 | El Partido Socialista realiza sus elecciones internas
27/03/2017 | Dos hombres adeudaban más de \$14 millones por pensión de alimentos, detenidos por la PDI Copilapó
27/03/2017 | Un extranjero detenido por amenazar a detective mientras era fiscalizado
27/03/2017 | Cuatro detenidos tras ver frustrado intento de robar en la tienda La Polar
27/03/2017 | Mineras El Abra y Sierra Gorda valoran aporte de Exponer a revisión de desafíos del sector
27/03/2017 | Estudio en plantas fotovoltaicas de Atacama permitió establecer principales fallas en este tipo de generación solar
08/03/2017 | "Junabec: 347 mil estudiantes de Educación Superior de todo el país recibirán Beca de Alimentación
02/03/2017 | Dirigentes de Comités "La Florida" Interpusieron Recurso de Protección en contra de Seremi de Vivienda
01/03/2017 | Hoy someten a segunda operación a alcalde Marcos López tras infarto al miocardio
01/03/2017 | Dos delinictos por robo con violencia tras persecución de Carabineros
03/03/2017 | Respeto del proyecto habitacional "La Florida": Seremi MINVU desmiente categóricamente falta de voluntad para ejecutar proyecto habitacional en Tierra Amarilla

Ediciones Anteriores
Revive los conciertos de Kinross Chile
Síguenos también en facebook
Síguenos en... twitter
ADM7SIÓN
BASES DEL MUNDO DE CHILE
Indicadores Económicos
10 años de Juntos a los Niños de Atacama
PROPIEDADES ARRENDANDO VENTAS
Chañarillo

file:///C:/Users/usuario/Desktop/FIC%202015%20(Roberto)/Difusi%C3%B3n%20FIC%201504/Noticias,%20Articulos%20FIC%201504/Positivos%20avances%20pres



UNIVERSIDAD DE ATACAMA



REGISTRO DE ASISTENCIA
REUNIÓN DE AVANCE RESULTADOS DE PROYECTO FICADN VEGETAL 1504

Centro Regional de Investigación y Desarrollo Sustentable de Atacama
UNIVERSIDAD DE ATACAMA
25 de enero de 2017 - 10:15 hrs.
Campus Costanera, Sala N°1, Vallenar

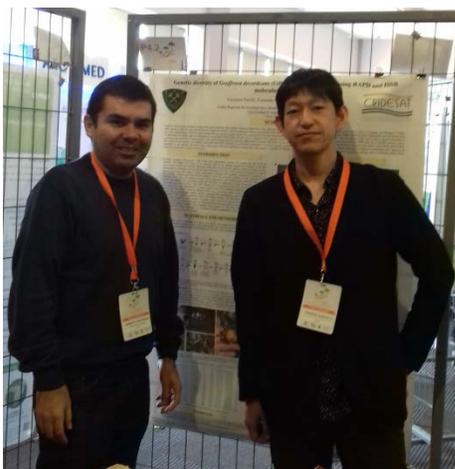
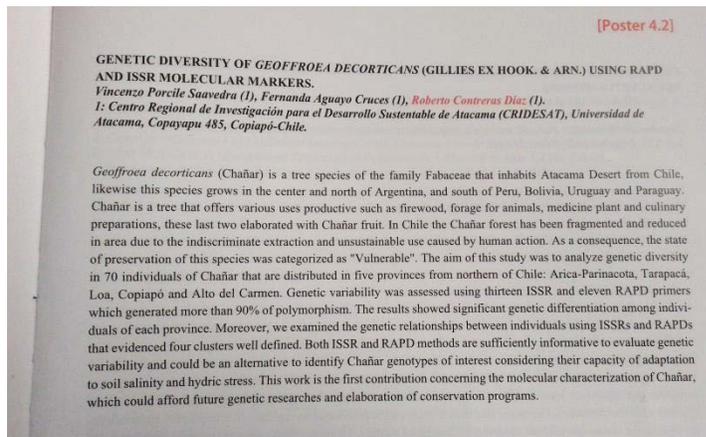
| NOMBRE | INSTITUCIÓN / CARGO | E MAIL / FONONO | FIRMA |
|---------------------------|-------------------------|---------------------------|-------|
| Roberto González Pardo | Verde de Oltin | robertome@verde.com | |
| DESERVO ZATOR | INIA | Jessica.zator@inia.cl | |
| VICENTE RODRIGUEZ O | AGROINDUSTRIAL OLIVIVRO | OLIVIVRO@VIVRO.COM | |
| OMAR GONZALEZ | UGA | omar.gonzalez@uda.cl | |
| WILHELMINA VARGAS | ASA - Huesco | Wilhelmina.vargas@asa.com | |
| Hermano y Margarita Lopez | ASA - Huesco | hermanoylopez@asa.com | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |



UNIVERSIDAD DE ATACAMA



Actividad N°4: Participación en Congreso Internacional IUFRO Tree Biotechnology



Actividad N° 6: Difusión de resultados en Radio Madero.





Actividad N°7: Seminario de Chañar

PROGRAMA

| Hora | Tema | Expositor |
|-------------|--|--|
| 8:30-9:00 | Inscripciones | Srta. Angelica Evensen; INFOR |
| 09:00-09:30 | Saludos de Autoridades | Sra. Pamela Pacheco; INFOR |
| 9:30-10:00 | Charla 1: Presentación General del Proyecto | Dra. Sandra Gacitúa; Subgerente Sede Diaguitas INFOR |
| 10:00-10:30 | Charla 2: Recurso Forestal Chañar, en la región de Atacama | CONAF-Región de Atacama: por definir |
| 10:30-11:00 | Charla 3: Biodiversidad de las poblaciones de Chañar, uso de biotecnología | Sr. Roberto Contreras CRIDESAT-UDA |
| 11:00-11:30 | CAFE | |
| 11:30-12:00 | Charla 4: Importancia del recurso Chañar para los pequeños propietarios. | Sr. José Cordero Comunidad Piedra Luna |
| 12:30-13:00 | Mesa Redonda (moderador Sandra Gacitúa) | Todos los expositores |
| 13:00-14:30 | Almuerzo (casino de MOP) | |
| 15:00—15:30 | Charla 5: Selección de árboles plus y productividad frutal en poblaciones de chañar en la cuenca del río Copiapó | Sr. Braulio Gutiérrez; INFOR |
| 15:30-16:00 | Charla 6: Áreas potenciales para establecimiento y producción de frutos de Chañar | Sr. Enrique Villalobos; INFOR |
| 16:00-16:30 | Charla 7: Manejo silvícola para la producción de frutos de Chañar en la región de Atacama. | Sr. Juan Carlos Pinilla; INFOR |
| 16:30-17:30 | Charla 8: Daño en frutos de Chañar por <i>Amblycerus dispar</i> y dinámica poblacional en la producción de frutos. | Luis Cerda; UDEC |
| 17:30-18:00 | Mesa Redonda (moderador Sandra Gacitúa) | Todos los expositores |
| 18:00-18:30 | Coctel de Camaradería | |



Tema del día



ALUMNOS DE COPIAPO, CALDERA Y CHAÑARAL EN EL TRABAJO PRACTICO DE OBTENCION DE ADN EN UN LABORATORIO DE LA UDA.

Estudiantes realizaron inédito curso de genética vegetal en laboratorios de la UDA

Resumen

Investigación y desarrollo

El curso de genética vegetal en los laboratorios de la UDA, permitió a los estudiantes de los liceos de Copiapó, Caldera y Chañaral, obtener conocimientos prácticos en el laboratorio de ADN.

El curso de genética vegetal en los laboratorios de la UDA, permitió a los estudiantes de los liceos de Copiapó, Caldera y Chañaral, obtener conocimientos prácticos en el laboratorio de ADN.

El curso de genética vegetal en los laboratorios de la UDA, permitió a los estudiantes de los liceos de Copiapó, Caldera y Chañaral, obtener conocimientos prácticos en el laboratorio de ADN.

El curso de genética vegetal en los laboratorios de la UDA, permitió a los estudiantes de los liceos de Copiapó, Caldera y Chañaral, obtener conocimientos prácticos en el laboratorio de ADN.

AVANCE. Desarrollado por investigadores del CRIDESAT-UDA, abordó el trabajo práctico-científico en la obtención de ADN, permitiendo a los asistentes replicar el trabajo del laboratorio.



ESTUDIANTES EN UN GRUPO DE TRABAJO EN EL LABORATORIO DE LA UDA.

El curso de genética vegetal en los laboratorios de la UDA, permitió a los estudiantes de los liceos de Copiapó, Caldera y Chañaral, obtener conocimientos prácticos en el laboratorio de ADN.

El curso de genética vegetal en los laboratorios de la UDA, permitió a los estudiantes de los liceos de Copiapó, Caldera y Chañaral, obtener conocimientos prácticos en el laboratorio de ADN.

<http://www.diarioatacama.cl/impres/2017/11/26/full/cuerpo-principal/2/>



10 profesores

de Copiapó en la ubicación de Atacama, el cual se evaluará en conjunto por la Universidad de Atacama.

90 por ciento

de casos fueron positivos, un 10 por ciento de los estudiantes y la mayoría en Santiago.



LOS ALUMNOS PARTICIPAN EN EL PROYECTO.



ACTIVIDADES EN LA UBICACIÓN DE ATACAMA.

Commemoran día contra la violencia de la mujer

INTERVENCIÓN. Diversas actividades se realizaron en Copiapó.

Una mesa conmemorativa se celebró en la ubicación de Atacama contra la violencia de género en Copiapó. La actividad se realizó con el propósito de sensibilizar a la comunidad sobre la violencia de género y promover acciones preventivas y educativas en materia de violencia de género.

Además, se celebró la entrega de la medalla a las víctimas de la violencia de género en Copiapó. La mesa conmemorativa se celebró en la ubicación de Atacama, el cual se evaluará en conjunto por la Universidad de Atacama.

Además, se celebró la entrega de la medalla a las víctimas de la violencia de género en Copiapó. La mesa conmemorativa se celebró en la ubicación de Atacama, el cual se evaluará en conjunto por la Universidad de Atacama.

Además, se celebró la entrega de la medalla a las víctimas de la violencia de género en Copiapó. La mesa conmemorativa se celebró en la ubicación de Atacama, el cual se evaluará en conjunto por la Universidad de Atacama.

Además, se celebró la entrega de la medalla a las víctimas de la violencia de género en Copiapó. La mesa conmemorativa se celebró en la ubicación de Atacama, el cual se evaluará en conjunto por la Universidad de Atacama.

trabajo en el laboratorio y la evaluación de los resultados.

TRABAJO DE LABORATORIO

Entre los objetivos de la actividad se encuentran sensibilizar a la comunidad sobre la violencia de género y promover acciones preventivas y educativas en materia de violencia de género.

Además, se celebró la entrega de la medalla a las víctimas de la violencia de género en Copiapó. La mesa conmemorativa se celebró en la ubicación de Atacama, el cual se evaluará en conjunto por la Universidad de Atacama.

función, con la finalidad de evaluar los resultados y los aprendizajes de la actividad.

PROYECTO FICADN VEGETAL

El proyecto FICADN Vegetal de Atacama se realizó en el marco de la actividad de sensibilización y promoción de la cultura de la ciencia y la tecnología en la ubicación de Atacama.

Además, se celebró la entrega de la medalla a las víctimas de la violencia de género en Copiapó. La mesa conmemorativa se celebró en la ubicación de Atacama, el cual se evaluará en conjunto por la Universidad de Atacama.



ALUMNOS PARTICIPAN EN EL PROYECTO FICADN VEGETAL.

El proyecto FICADN Vegetal de Atacama se realizó en el marco de la actividad de sensibilización y promoción de la cultura de la ciencia y la tecnología en la ubicación de Atacama.

Además, se celebró la entrega de la medalla a las víctimas de la violencia de género en Copiapó. La mesa conmemorativa se celebró en la ubicación de Atacama, el cual se evaluará en conjunto por la Universidad de Atacama.

El proyecto FICADN Vegetal de Atacama se realizó en el marco de la actividad de sensibilización y promoción de la cultura de la ciencia y la tecnología en la ubicación de Atacama.

Además, se celebró la entrega de la medalla a las víctimas de la violencia de género en Copiapó. La mesa conmemorativa se celebró en la ubicación de Atacama, el cual se evaluará en conjunto por la Universidad de Atacama.

antay **TODOS LOS DOMINGOS** De 12.00 A 16.00 HRS. **Buffet Familiar**

<http://www.diarioatacama.cl/impres/2017/11/26/full/cuerpo-principal/3/>



UNIVERSIDAD DE ATACAMA
DEPARTAMENTO DE RECURSOS HUMANOS
REGISTRO I

AUTORIZA EJECUCIÓN DE CURSO PRACTICO DE
EXTENSIÓN CRIDESAT

COPIAPÓ, 11 octubre de 2017

RESOLUCIÓN EXENTA Nº 257

VISTOS:

Lo dispuesto en los D.F.L. Nros. 37 y 151, de 1981, el Decreto Supremo Nº 377, de 2014, todos del Ministerio de Educación Pública; la Resolución Nº1600, de 2008, de la Contraloría General de la República; el Decreto UDA Nro. 010 de 2000 y sus modificaciones, 027 de 2007 y sus modificaciones, Resolución Exenta UDA Nº 078, de 2004 y en el art. 52 de la ley 19.880:

CONSIDERANDO:

La Providencia nº 211, de 10 de octubre del Sr. Vicerector Académico.

El Ord. 53, de 05 de octubre de 2017, del Sr. Director de Proyecto FIC1504, y Director CRIDESAT.

La Resolución Exenta Nº 09, Registro H, de 11 de marzo de 2016 que Regulariza y aprueba convenios de transferencia de recursos fondo de innovación para la competitividad suscritos entre el Gobierno Regional de la Región de Atacama y la Universidad de Atacama año 2015.

RESUELVO:

AUTORIZASE la dictación del curso práctico de extensión a realizarse en cuatro clases: los días 12 y 19 de octubre y 7 y 15 de noviembre, denominado: "Genética vegetal a profesores y estudiantes de la Región de Atacama, en el marco del plan de difusión para beneficiarios no directos del Proyecto FIC 1504 <<Desarrollo de un kit de identificación genética para apoyar la denominación de Origen de Productos elaborados de aceituna Sevillana del Huasco y Chañar de Atacama (ADN vegetal de Atacama)>>" según se indica a continuación:

- NOMBRE CURSO-PRACTICO** : Curso práctico sobre la técnica "Reacción en Cadena de las Polimerasas (PCR)" para docentes y alumnos de colegios de Atacama
- METODOLOGÍAS** : Clase práctica 90% y Clase teórica 10%
- DURACIÓN** : 8 horas
- PROFESOR** : Dr. Roberto Contreras Díaz, Especialista en Genética Vegetal
- ASISTENTES** : Vincenzo Porcile Saavedra, Biotecnólogo
Fernanda Aguayo Cruces, Biotecnóloga
- PARTICIPANTES** : Total 90 personas (20 profesores y 70 estudiantes escolares)
- UNIDAD EJECUTORA** : CRIDESAT
- LUGAR** : Laboratorio CRIDESAT
- OBJETIVO GENERAL** : Apoyar el aprendizaje de la biología molecular a profesores y estudiantes escolares de la región de Atacama a través de la utilización de la técnica de Reacción en Cadena de Polimerasas (PCR)
- OBJETIVO TRANSVERSALES** : 1) Preparar reacciones bioquímicas
2) Aprender a usar equipos científicos de laboratorio
- ACTIVIDADES** : Primera sesión: Extracción de ADN de Tejido Vegetal
Segunda sesión: Uso de PCR con cebadores específicos de plantas
Tercera sesión: Discusión de los resultados



ASISTENCIA

Curso práctico de Genética vegetal para docentes y alumnos de colegios de la Región de Atacama: Aplicación de la Reacción en Cadena de las Polimerasas (PCR)

Fecha: 12 de octubre de 2017

| Nombre EE | Nombres | Apellidos | RUT | FIRMA |
|-----------------------------|-------------------|-------------------|---------------|-------|
| Liceo Bicentenario | Rodrigo | Levín González | 12.022.687-8 | |
| Liceo Bicentenario | Claudio | Funes Lillo | 20.410.070-5 | |
| Liceo Bicentenario | Annett | Castro Barriga | 20.410.226-0 | |
| Liceo Tecnológico | Jennifer | Pereira Tello | 15.041.138-6 | |
| Liceo Tecnológico | Catalina Isabella | Durán Salgado | 22.962.737-6 | |
| Liceo Tecnológico | Iván Luis | Tapia Pérez | 20.796.062-4 | |
| Liceo de Música | Ingrid Margot | Alamos Correa | 13.745.051-8 | |
| Liceo de Música | Fernanda Michelle | Jofré Iribarren | 22.892.759-7 | |
| Liceo de Música | Felipe Andrés | Acuña Olivares | 20.410.210-4 | |
| Liceo José Antonio Carvajal | Aldo Miguel | Araya Luci | 14.446.675-6. | |
| Liceo José Antonio Carvajal | Luhán Keissy | Eterovic Castillo | 20.152.908-5 | |
| Liceo José Antonio Carvajal | Juan Manuel | Arraño Espinoza | 20.015.279-4 | |
| Liceo El Palomar | Claudia Valentina | Rojas Alfaro | 16.109.252-5 | |
| Liceo El Palomar | Enrique Ignacio | Zepeda Segovia | 19.452.405-6 | |
| Liceo El Palomar | Daniela Aracelly | Plaza Tapia | 19.780.813-6 | |



ASISTENCIA

Curso práctico de genética vegetal para docentes y alumnos de colegios de la Región de Atacama: Aplicación de la Reacción en Cadena de las Polimerasas.

FECHA: 19 de octubre de 2017

| Nombre EE | Nombres | Apellidos | RUT | FIRMA |
|----------------------------|------------------------|------------------|--------------|-------|
| Manuel Blanco Encalada | Ruth Isabel | Diaz Rojas. | 15.055.834-4 | |
| Manuel Blanco Encalada | Alexis Giovanny | Guerrero Mallega | 20.782.262-0 | |
| Manuel Blanco Encalada | Marcell de los Ángeles | Solar Peña | 20.586.236-6 | |
| Inst. Comercial | ALEJANDRA | TORRES BARRERA | 15.030.143-2 | |
| Inst. Comercial | LIDIA | DÍAZ GONZÁLEZ | 20.411.296-7 | |
| Inst. Comercial | FELIPE | GODOY ALCAYAGA | 20.917.592-4 | |
| Federico Varela | Cecilia | Castro Cerda | 9.928.209-6 | |
| Federico Varela | Francisca | Burgos Pérez | 20.740.993-6 | |
| Federico Varela | Javier | Geraldo Aladana | 20.892.979-8 | |
| Sagrado Corazón | ROSA AÍDA | GOIC CORTES | 8.895.076-3 | |
| Sagrado Corazón | MARCELA ANITA | ILLANES JORQUERA | 20.994.006-K | |
| Sagrado Corazón | GLENDIA ANAÍS | CAÑILLO ORELLANA | 20.947.504-9 | |
| Jorge Alessandri Rodríguez | Cristhian | Saavedra Toledo | 17.194.789-8 | |
| Jorge Alessandri Rodríguez | Nelson Nicolás | Marcoleta Araya | 21.022.686-9 | |
| Jorge Alessandri Rodríguez | Estefanía | Sastoque Ospina | 25.247.436-6 | |

**4.13.-Resumen de metas obtenidas por actividad según indicador de resultado**

Tabla 22: Tabla resumen de metas obtenidas según indicador de resultados

| Nombre de la Actividad | Indicador de resultado | Resultado actual |
|--|---|---|
| 1.-Recolección de muestras vegetales de aceituna Sevillana del Huasco. | - 100 muestra de hojas de 100 individuos y 50 muestras de frutos de 50 individuos del Valle del Huasco. | - 100% completado (ver Anexo 1) |
| | - 1000 ml de aceite (50 ml por 20 productores de aceite) | - 100% completado (ver Anexo 1) |
| | - 50 muestras de hojas y 50 frutos de variedades de olivos en la E.E. INIA Huasco. | - 100% completado (ver Anexo 1) |
| | - 100 hojas y 100 frutos de 100 individuos de Sevillana de Valle de Azapa (Arica). | - 100% completado (ver Anexo 1) |
| | - 50 hojas y 50 frutos de 50 individuos de Sevillana de Antofagasta. | - No se observó establecimiento de árboles centenarios de sevillana en Antofagasta. Se consultó además a profesionales de INDAP y agricultores de la Región de Antofagasta. |
| | - 100 hojas y 100 frutos de 100 individuos de Sevillana de Copiapó. | - 100% completado (ver Anexo 1) |
| | - 50 hojas de 50 individuos de Sevillana de Totoral. | - 100% completado |
| 2.-Recolección de muestras vegetales de Chañar | - 100 hojas y 100 frutos de 100 individuos del Valle de Copiapó. | - 100% de individuos de Chañar colectados. (ver Anexo 1) |
| | - 50 hojas y 50 frutos de 50 individuos del Valle del Huaso. | - 100% de muestras de hojas. (ver Anexo 1) |
| | - 50 hojas y 50 frutos de 50 individuos de la Región de Coquimbo. | - 100% completado (ver Anexo 1) |



| | | |
|---|--|---------------------------------|
| | - 50 hojas y 50 frutos de 50 individuos de la Región de Antofagasta. | - 100% completado (ver Anexo 1) |
| | - 50 hojas y 50 frutos de 50 individuos de la Región de Tarapacá. | - 100% completado (ver Anexo 1) |
| | - 50 hojas y 50 frutos de 50 individuos de la Región de Arica-Parinacota. | - 100% completado (ver Anexo 1) |
| 3.-Caracterización morfológica varietal y del ambiente de la zona geográfica de Sevillana y Chañar. | - 100 caracterizaciones morfológicas de frutos de sevillanas de Huasco, y 300 caracterizaciones morfológicas del resto del país. | - 100% completado (ver Anexo 2) |
| | - 100 caracterizaciones morfológicas de frutos de chañar del Valle de Copiapó, y 300 caracterizaciones morfológicas de Chañar provenientes del resto del país. | - 100% completado (ver Anexo 2) |
| | - Caracterización de ambiente, suelo y agua del Valle del Huasco y el Valle de Copiapó basado en compilación de información de instituciones regionales (INIA, INDAP, CONAF, DGA y otros). | - 100% completado |
| 4.-Extracción de ADN de muestras vegetales y productos elaborados base de Sevillana y Chañar. | - 450 extracciones de ADN de hojas de Sevillana de 450 individuos provenientes del norte de Chile. | - 100% completado |
| | - 250 extracciones de ADN de fruto de Sevillana de 250 individuos provenientes del norte de Chile. | - 100% completado |
| | - 20 extracciones de ADN de muestras de aceite de oliva de Sevillana (20 empresas) | - 100% completado. |
| | - 100 extracciones de ADN de hoja de otras variedades de olivos (no Sevillana). | - 100% completado. |



| | | |
|---|---|--|
| | - 450 extracciones de ADN de hojas de Chañar de 450 individuos provenientes del norte de Chile. | - 100% completado |
| | - 250 extracciones de ADN de fruto de Chañar de 250 individuos provenientes del norte de Chile. | - 100% completado |
| | - 60 extracciones de ADN de muestras de arrope de Chañar. | - 100% completado |
| | - 40 extracciones de ADN de harina de Chañar. | - 100% completado |
| | - 30 extracciones de aceite de Chañar. | - No hay aceite de Chañar, es poco lo que se produce. |
| | - 50 extracciones de ADN de otros ecotipos de Chañar fuera del país. | - No se pudo realizar internación de especies de Chañar desde otros países ya que el SAG no lo permite, sin embargo, esto no afectaría al objetivo del proyecto ya que se busca denominación de origen (DO) para nuestros productos de chañar dentro de territorio chileno. Además el INAPI se basa en otorgar DO basándose en lo que existe en territorio nacional. |
| 5.-Evaluación de marcadores moleculares de ADN en Sevillana y Chañar. | - 450 análisis de perfil genético con marcadores ISSR y RAPD de muestras de Sevillana del Huasco y el resto de Chile. | - 100% completado |
| | - 200 análisis de perfil genético con marcadores SSR de muestras de Sevillana del Huasco y el resto de Chile. | - 100% completado |
| | - 30 análisis de perfil genético de aceite de oliva del Huasco con marcador SSR. | - 100% completado |



| | | |
|---|---|---|
| | - 50 análisis de perfil genético con otras variedades de oliva con marcador SSR. | - 100% completado |
| | - 60 secuencias de ADN (800 pb) de Sevillana de Huasco de 60 individuos y 30 secuencias de sevillana de otras regiones. | - 100% completado (ver Anexo 4) |
| | - 450 análisis de perfil genético con marcadores ISSR y RAPD de muestras de Chañar de Copiapó y el resto de Chile. | - 100% completado |
| | - 200 análisis de perfil genético con marcadores SSR de muestras de Chañar de Copiapó y el resto de Chile. | - 100% completado |
| | - 40 análisis de perfil genético de arropo de Chañar con marcador SSR. | - 100% completado |
| | - 50 análisis de perfil genético de Chañar con otros ecotipos de otras regiones con marcador SSR. | - 100% completado |
| | - 60 secuencias de ADN (800 pb) de Chañar de Copiapó de 60 individuos y 30 secuencias de Chañar de otras regiones. | - 100% completado (ver Anexo 4) |
| 6.-Desarrollo de Kit de identificación genética para Sevillana del Huasco y Chañar de Atacama | -Desarrollo de 1 kit de identificación genética para la Sevillana del Huasco.- | 100% completado |
| | -Desarrollo de 1 kit de identificación genética para el Chañar. | 100% completado |
| 7.-Elaboración de artículos científicos en revistas indexadas | 1 Artículo científico sobre variedad de olivo Sevillana. | 100% completado ANEXO 5 |
| | 1 Artículo científico sobre chañar. | 200% completado (Se elaboraron dos artículos científicos de chañar) ANEXO 5 |



5.-CONCLUSIÓN

- Las características morfológicas de los frutos de la variedad Sevillana (Azapa) presenta diferencias de tamaño y peso entre los producidos en el Valle de Huasco y Valle de Azapa, siendo los frutos de Azapa significativamente de mayor tamaño y peso que los del Huasco, debido probablemente a la temperatura más cálida que presenta Azapa .
- Al igual que los frutos de olivo, observamos diferencias significativas de tamaño y peso en los frutos de Chañar, siendo los frutos de Azapa-Lluta de mayor tamaño y peso que los de Pachica, Calama, San Pedro de Atacama, Copiapó y Alto del Carmen, y así como en la aceituna, esto debido al parecer a la mayor temperatura que presenta el Valle de Azapa-Lluta.
- Se ha desarrollado un método de extracción de ADN para hoja, frutos, harina y arrope de chañar, no habiendo sido documentado ni reportado anteriormente.
- A partir de cuatro protocolos de extracción de ADN de aceite de oliva, se desarrolló un nuevo método el cual combina lo mejor de cada uno, obteniendo mayor cantidad de ADN (a partir de 2 mL de aceite) a partir de aceites elaborados de manera artesanal o bien con métodos modernos como centrifugado en frío.
- Se ha podido identificar genéticamente árboles de cualquier variedad de olivo a partir de marcadores moleculares ISSR, RAPD y SSR, éste último con mejor resultado.
- Se consiguió por primera vez observar con marcadores ISSR y SSR la existencia de diferencias polimórficas entre árboles de chañar de distintas regiones del norte de Chile, lo cual sirve como base para justificar la DO de productos de chañar de Copiapó, ya que estos árboles son exclusivos de su localidad geográfica.
- Se ha cuantificado a través de cinco marcadores de ADN la existencia de diferencias genéticas entre frutos y harinas de chañar de diferentes regiones del país, lo cual también sirve como base para justificar la DO de productos de chañar de Copiapó.
- Se logró determinar el límite de detección de un aceite que posee Sevillana del Huasco, observando la detección de la variedad Sevillana al 10% del contenido en aceite, incluso creemos que con el método se puede detectar a menos del 5%.
- Se consiguió diferenciar genéticamente cualquier variedad de aceitunas a partir de los marcadores moleculares SSR, diferenciando sobre todo la Sevillana del Huasco de las del resto de aceitunas comercializadas en Chile.



- Se ha podido caracterizar genéticamente, a partir de tres marcadores SSR, los aceites de oliva de distintas partes de Chile, logrando identificar la variedad con la cual se elaboró, sin embargo, la variedad Sevillana o Azapa tiene alelos muy parecidos a los de Arbusana y Picual, lo que dificulta su identificación exacta, pero se puede resolver estudiando otros potenciales marcadores SSR.
- Se ha conseguido desarrollar un kit de identificación genética para aceituna y pastas de olivo, y además, la identificación de aceites elaborados con Sevillana.
- Se ha conseguido desarrollar el primer kit de identificación genética para frutos y harina de chañar, materia prima base para producir arropo de chañar.



6.-REFERENCIAS

Antúnez, A.; Cajías, E.; Román, L.F y González, M. (Eds.). 2014. Riego y Producción de Olivos en el Valle de Azapa. Instituto de Investigaciones Agropecuarias, INIA Ururi, Arica, Chile. Boletín INIA N° 292, 92 p.

Arif M, NW Zaidi, YP Singh. 2009. A comparative analysis of ISSR and RAPD markers for study of genetic diversity in Shisham (*Dalbergia sissoo*). *Plant Molecular Biology Reporter* 27: 488-495, DOI: 10.1007/s11105-009-0097-0

Annan, X., B.C. López, J. Martínez-vilalta, M. Estorach, and R. Poyatos. 2012. The age of monumental olive trees (*Olea europaea*) in northeastern Spain. *Dendrochronologia* 30:11–14.

Bauer, T., Weller, P., Hammes, W. P., & Hertel, C. (2003). The effect of processing parameters on DNA degradation in food. *European Food Research and Technology*, 217, 1438–2377

Baye, M.T.; T. Abebe & R.A. Wilke (2011). Genotype-environment interactions and their translational implication. *Personalized Medicine*, 8, 59-70.

Busconi, M., L. Sebastiani, and C. Fogher. 2006. Development of SCAR markers for germplasm characterisation in olive tree (*Olea europaea* L.). *Molecular Breeding* 17(1):59-68.

Carriero F, Fontanazza G, Cellini F, Giorio G (2002) Identification of simple sequence repeats (SSRs) in olive (*Olea europaea* L.). *Theor Appl Genet* 104:301–307

Cipriani G, Marrazzo MT, Marconi R, Cimato A, Testolin R (2002) Microsatellite markers isolated in olive are suitable for individual fingerprinting and reveal polymorphism within ancient cultivars (*Olea europaea* L.). *Theor Appl Genet* 104:223–228

Clarke J. 2006. Antiquity of aridity in the Chilean Atacama Desert. *Geomorphology* 73:101-114, DOI: 10.1016/j.geomorph.2005.06.008.

Claros, M.G., R. Crespillo, M.L. Aguilar, and F.M. Cánovas. 2000. DNA fingerprinting and classification of geographically related genotypes of olive-tree (*Olea europaea* L.). *Euphytica* 116(2):131-142.

Consolandi, C.; Palmieri, L.; Severgnini, M.; Maestri, E.; Marmioli, N.; Agrimonti, C.; Baldoni, L.; Donini, P.; De Bellis, G.; Castiglioni, B. (2008). A procedure for olive oil traceability and authenticity: DNA extraction, multiplex PCR and LDR-universal array analysis. *Eur. Food Res. Technol.* 227, 1429–1438

Contreras R y Tapia F. 2016. Identificación genética de la variedad de olivo (*Olea europaea* L.) Sevillana y su relación con variedades productivas existentes en la provincia del Huasco. *IDESIA (Chile)* 34(3): 15-22



Costa, I., Mafra, I., Amaral, J. S., & Oliveira, M. B. (2010). Detection of genetically modified soybean DNA in refined vegetable oils. *European Food Research And Technology*, 230, 915–923

Costagama MS, IC Zampini, MR Alberto, S Cuello, S Torres, J Pérez, C Quispe, G Schmeda-Hirrschmann, MI Isla. 2016. Polyphenols rich fraction from *Geoffroea decorticans* fruits flour affects key enzymes involved in metabolic syndrome, oxidative stress and inflammatory process. *Food Chemistry* 190: 392-402, DOI: 10.1016/j.foodchem.2015.05.068

ChileOliva. 2012. Informe anual del mercado nacional de aceite de oliva. Disponible en www.chileoliva.cl/files/INFORME%20ANUAL%20DEL%20MERCADO%202012.pdf (Consulta 04 Noviembre 2017).

ChileOliva. 2015. Informe anual del mercado nacional de aceite de oliva. Disponible en: www.chileoliva.cl/wp-content/uploads/2017/04/INFORME-ANUAL-MERCADO-NACIONAL-DE-ACEITE-DE-OLIVA-2015.pdf (consulta 04 Noviembre 2017).

Chisha-Kasumu E, S Woodward, A Price. 2009. RAPD markers demonstrate genetic diversity in *Pterocarpus angolensis* from Zimbabwe and Zambia. *Southern Forest: a journal of Forest Science* 71:41-47, DOI: 10.2989/SF.2009.71.1.9.746

DGA. (2004a). Diagnóstico y clasificación de los cuerpos de agua según objetivo de calidad: Cuenca del Huasco. Ministerio de obras públicas, Dirección General de Aguas (DGA).

DGA. (2004b). Diagnóstico y clasificación de los cuerpos de agua según objetivo de calidad: Cuenca de Copiapó. Ministerio de obras públicas, Dirección General de Aguas (DGA).

Doyle, J.J., and J.L Doyle. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Focus* 12:13-15.

Fang, G., Hammar, S., and Grumet, R. 1992. A quick and inexpensive method for removing polysaccharides from plant genomic DNA. *Biotechniques* 13(1): 52-4. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1503775>

Fabbri, A., Bartolini, G., Lambardi, M. and Kailis, S. (2004) Olive Propagation Manual. CSIRO Publ., Australia, pp. 130.

Felsenstein J. 2001. PHYLIP (PHYLogeny Inference Package). Version 3.6a2.1. Seattle, WA: Department of Genome Sciences, University of Washington

Gacitúa S y E Villalobos. 2012. Programa de fortalecimiento de capacidades para el uso sostenible de los recursos naturales suelo-agua-bosque en zonas áridas y semiáridas del norte de Chile. Instituto Forestal (INFOR). Consultado 06 oct. 2016. Disponible en <http://biblioteca.infor.cl/DataFiles/30806.pdf>

Galimberti, A., De Mattia, F., Losa, A., Bruni, I., Federici, S., Casiraghi, M., Martellos, S. & Labra, M. (2012). DNA barcoding as a new tool for food traceability. *Food Research International* 50, 55–63.



Giménez M.J., F. Pistón, A. Martína, S.G. Atienza. (2010). Application of real-time PCR on the development of molecular markers and to evaluate critical aspects for olive oil authentication Food Chemistry, 118 (2), pp. 482-487

Ginwal, H. S., & Maurya, S. S. (2010). Evaluation and optimization of DNA extraction method for Dalbergia sissoo leaf. Indian Journal of Biotechnology 9: 69-73. <http://hdl.handle.net/123456789/7127>

Hammer, Ø., D.A.T Harper, and P.D. Ryan. 2001. PAST: paleontologicalstatistics software package for education and data analysis. Palaeontologia Electronica, 4, 9 pp

Hashiguchi, U.P. 2005. Formulación de un producto moldeado a base de pasta de aceituna: Aceituna Duquesa. Tesis de pregrado para optar al título de Ingeniero de Alimentos. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. Universidad de Chile. Santiago, Chile.

Hellberg, R. S., & Morrisey, M. T. (2011). Advances in DNA-based techniques for the detection of seafood species substitution on the commercial market. Journal of Laboratory Automation, 16, 308–321.

Hidalgo, J. 1993. Algunas notas para la historia del olivo en Arica (Chile). IDESIA 12: 31-50.

Hollingsworth, M. L., Clark, A. A., Forrest, L. L., Richardson, J., Pennington, R. T., Long, D. G., et al. (2009). Selecting barcoding loci for plants: Evaluation of seven candidate loci with species level sampling in three divergent groups of land plants. Molecular Ecology Resources, 9, 439–457

Hurrell, J. A., & Ulibarri, E. (2011). Leguminosas medicinales y alimenticias utilizadas en la conurbación Buenos Aires-La Plata, Argentina. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas 10(5): 443-455. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=85622430006>

Hutchenson K. 1970. A test for comparing diversities based on the Shannon formula. Journal of Theoretical Biology 29:151-154, DOI: 10.1016/0022-5193(70)90124-4

INIA. (2001). Caracterización de la salinidad de los suelos y aguas del Valle del Río Copiapó. Boletín INIA N°70. Centro Regional Intihuasi, 31 pag. La Serena-Chile.

INIA(a). Suelos y Climas del Valle del Huasco y sus alternativas de cultivo, En: Proyecto “Validación de Tecnologías de riego en el Valle del Huasco”. Cartilla divulgativa N° 1. Centro Regional Intihuasi y CNR. La Serena-Chile.

Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J. & White, T. J. (1990). Amplification of genomic DNA. PCR protocols: A guide to methods and applications. Elsevier. ISBN: 978-0-12-372180-8. <https://www.sciencedirect.com/science/book/9780123721808>

International Olive Oil Council (IOOC). 2000. World Catalogue of Olive Varieties. Madrid: International Olive Oil Council.



International Olive Oil Council (IOOC). 2012. Lists of exporters/importers. Available at www.internationaloliveoil.org/estaticos/view/137-lists-of-exporters-importers (accessed 04 November 2017).

INAPI. (2017b). Aceite de oliva extra virgen del Valle del Huasco. Disponible en: <http://www.sellodeorigen.cl/611/w3-article-3048.html> (Consulta 04 Noviembre 2017).

INAPI (2017a), "Aceite de Oliva Extra Virgen del Valle del Huasco", available at: <http://www.sellodeorigen.cl/611/w3-article-3048.html> (accessed 04 November 2017).

Jiménez-Aspee F, C Theoduloz, MDPC Soriano, M Ugalde-Arbizu, MR Alberto, IC Zampini, MI Isla, MJ Simiriqiotis, G Schmeda-Hirschmann. 2017. The Native Fruit *Geoffroea decorticans* from Arid Northern Chile: Phenolic Composition, Antioxidant Activities and In Vitro Inhibition of Pro-Inflammatory and Metabolic Syndrome-Associated Enzymes. *Molecules* 22(9) pii:E1565, DOI: 10.3390/molecules22091565

Josiah CC, DO George, OM Eleazar, WF Nyamu. 2008. Genetic diversity in Kenyan populations of *Acacia Senegal* (L.) willd revealed by combined RAPD and ISSR markers. *African Journal of Biotechnology* 7(14): 2333-2340, DOI: 10.5897/AJB08.394.

Koehmstedt AM, Aradhya MK, Soleri D, Smith JL, Polito VS (2010) Molecular characterization of genetic diversity, structure, and differentiation in the olive (*Olea europaea* L.) germplasm collection of the United States Department of Agriculture. *Genet Resour Crop Evol* 58:519–531

Kolodinska BA, RV Bothmer, C Dayteg, I Rashal, S Tuveesson, J Weibull. 2004. Inter simple sequence repeat analysis of genetic diversity and relationships in cultivated barley of Nordic and Baltic origin. *Hereditas* 141:186-192, DOI: 10.1111/j.1601-5223.2004.01867.x

Lavin M, RT Pennington, BB Klitgaard, JI Sprent, HC de Lima, PE Gasson. 2001. The dalbergioid legumes (Fabaceae): delimitation of a pantropical monophyletic clade. *American Journal of Botany* 88: 503-533, DOI: 10.2307/2657116

Linos, A., N. Nikoloudakis, A. Katsiotis, and M. Hagidimitriou. 2014. Genetic structure of the Greek olive germplasm revealed by RAPD, ISSR and SSR markers. *Scientia Horticulturae* 175:33-43.

Lynch, M., and M.G. Milligan. 1994. Analysis of population genetic structure with RAPD markers. *Molecular Ecology* 3, 91–99 Incorrecto

Mafra, I., Ferreira, I. M. P. V. O., & Oliveira, M. B. P. P. O. (2008). Food authentication by PCR-based methods. *European Food Research and Technology*, 227, 649–665.

Martinez, I., Aursand, M., Erikson, U., Singstad, T. E., Veliyulin, E., & van der Zwaag, C. (2003). Destructive and non-destructive analytical techniques for authentication and composition analyses of foodstuffs. *Trends in Food Science and Technology*, 14, 489–498

Molina, M. 2015. El cultivo del olivo en la América colonial. *Chronica Nova* 41:121-142.



Montemurro C, Simeone R, Pasqualone A, Ferrara E, Blanco A. 2005. Genetic relationships and cultivar identification among 112 olive accessions using AFLP and SSR markers. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 80(1): 105-110.

Mullis, K.B., and F.A. Faloona. 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Method Enzymol* 155:335–350.

Naciri-Graven Y, Caetano S, Prado DE, Pennington RT, Spichiger R (2005) Development and characterization of 11 microsatellite markers in a widespread Neotropical seasonally dry forest tree species, *Geoffroea spinosa* Jacq. (Leguminosae). *Molecular Ecology Notes*, 5, 542–545

Nicolè, S., Erickson, D. L., Ambrosi, D., Bellucci, E., Lucchin, M., Papa, R., et al. (2011). Biodiversity studies in *Phaseolus* species by DNA barcoding. *Genome*, 54, 529–545

Novak, I., Gruber-Gréger, G., & Lukas, B. (2007). DNA-based authentication of plant extracts. *Food Research International*, 40, 388–392.

Orrabalis, C. J., Gorostegui, H., Calandri, E., & Guzmán, C. (2013). Parámetros funcionales y contenido de glucosa en harinas obtenidas de fruto maduro de "chañar" (*Geoffroea decorticans*) de la zona semiárida y árida de la provincia de Formosa. *Multequina* 22(1): 15-22. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=42829408002>

Padula G, Giordani E, Bellini E, Rosati A, Pandolfi S, Paoletti A, Pannelli G, Ripa V, De Rose F, Perri E, Buccoliero A and Mennone C (2008) Field evaluation of new olive (*Olea europaea* L.) selections and effects of genotype and environment on productivity and fruit characteristics. *Advances in Horticultural Science* 22: 87–94.

Panda S, D Naik, A Kamble. 2015. Population structure and genetic diversity of the perennial medicinal shrub *Plumbago*. *AoB Plants* 7: plv048, DOI: 10.1093/aobpla/plv048

Pasqualone, A., Lotti, C., & Blanco, A. (1999). Identification of durum wheat cultivars and monovarietal semolinas by analysis of DNA microsatellites. *European Food Research and Technology*, 210, 144–147

Peakall, R., and P.E Smouse. 2012. GenAIEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research – an update. *Bioinformatics* 28:2537-2539.

Phong DT, VTT Hlen, TTV Thanh, DV Tang. 2011. Comparison of RAPD and ISSR markers for assessment of genetic diversity among endangered rare *Dalbergia oliveri* (Fabaceae) genotypes in Vietnam. *Genetic and Molecular Research* 10(4): 2382-2393, DOI: 10.4238/2011.October.6.3

Pither R, JS Shore, M Kellman. 2003. Genetic diversity of the tropical tree *Terminalia amazonia* (Combretaceae) in naturally fragmented populations. *Heredity* 91, 307-313, DOI :10.1038/sj.hdy.6800299



Ramos-Gómez S., M.D. Busto, M. Pérez-Mateos, N. Ortega (2014). Development of a method to recovery and amplification DNA by real-time PCR from commercial vegetable oils Food Chemistry, 158, pp. 374-383

Reynoso MA, A Sánchez Riera, NR Vera. 2016. Nutraceutical Properties and Safety Evaluation of Fruits and Arrope of *Geoffroea decorticans* (Chañar). Journal of nutrition & Food Sciences, 6(2):485, DOI:10.4172/2155-9600.1000485

Salinas-Vásquez F., et al. 2014. Evaluación química del humus de lombriz roja californiana elaborado a partir de cuatro sustratos orgánicos en Arica. Idesia (Chile), 32(2): 95-99.

Santibañez C, M Vargas. 2017. *Geoffroea decorticans* for Biofuels: A Promising Feedstock. Journal of Renewable Energy Article ID 4216175 5 pages, DOI:10.1155/2017/4216175.

Scarano, D., & Rao, R. (2014). DNA markers for food products authentication. Diversity, 6:579-596. doi:10.3390/d6030579

Sefc K, Lopes MS, Mendonça D, Rodrigues Dos Santos M, Da Câmara Laimer, Machado MD, Câmara Machado A (2000) Identification of microsatellite loci in olive (*Olea europaea*) and their characterization in Italian and Iberian olive trees. Mol Ecol 9:1171–1173

Sesli, M., and E.D. Yegenoglu. 2017. Genetic relationships in wild olives (*Olea europaea* ssp. *oleaster*) by ISSR and RAPD markers, Biotechnology & Biotechnological Equipment 31(5):897-904.

Sheng Y, W Zheng, K Pei, K Ma. 2005. Genetic variation within and among populations of a dominant desert tree *Haloxylon ammodendron* (Amaranthaceae) in China. Annals of Botany 96(2): 245-252, DOI: 10.1093/aob/mci171

Sotomayor, E. 2000. Descripción del cultivar “Azapa” *Olea europaea* L. del Valle de Azapa. IDESIA (Chile) 18:61-66.

Squeo FA, G Arancio, JR Gutiérrez. 2008. Libro Rojo de la Flora Nativa y de los Sitios Prioritarios para su Conservación: Región de Atacama. La Serena, Chile. Ediciones Universidad de La Serena. 466 p.

Sudy, A., and P. Cortés. 2012. Aceite de Oliva. Disponible en: www.odepa.gob.cl/odepaweb/publicaciones/doc/4878.pdf (Consulta 04 Noviembre 2017). Cita se debe presentar en español

Tapia F., et al. 2003. Manual del Cultivo del Olivo. Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA), Intihuasi. Boletín INIA N° 101. La Serena-Chile.

Tapia F, Arancibia V, Larrea D, Santelices S, Araniti V, Bauzá M, Salas C, Rojas A. (2015). Producción de aceite de oliva Blend variedad Sevillana como base para la denominación de origen de aceite de oliva del Valle del Huasco. INIA Intihuasi, La Serena, Chile. Boletín N° 318.



Torres A. y Acevedo E. (2008). EL PROBLEMA DE SALINIDAD EN LOS RECURSOS SUELO Y AGUA QUE AFECTAN EL RIEGO Y CULTIVOS EN LOS VALLES DE LLUTA Y AZAPA EN EL NORTE DE CHILE. *Idesia (Chile)*, 26(3): 31-44.

van Oosterhout C, Hutchinson WF, Wills DPM, Shipley P. 2004. Micro-checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Mol. Ecol. Notes*.4:535–538.

Wesche K, I Hensen, R Undrakh. 2006. Range-wide genetic analysis provides evidence of natural isolation among populations of the Mongolian endemic *Potentilla ikonnikovii* Juz. (Rosaceae). *Plant Species Biology* 21: 155-163, DOI: 10.1111/j.1442-1984.2006.00161.x

Williams, J.G., A.R. Kubelik, K.J. Livak, J.A. Rafalski, and S.V. Tingey. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, 18:6531-6535.

Ye, Y.M., J.W. Zhang, G.G. Ning, and M.Z. Bao. 2008. A comparative analysis of the genetic diversity between inbred lines of *Zinnia elegans* using morphological traits and RAPD and ISSR markers. *Scientia Horticulturae* 118(1):1-7.

Zietkiewicz, E., A. Rafalski, and D. Labuda. 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat. (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics* 20:176-183.



7.-ANEXOS

Anexo 1: Localización geográfica de muestras de olivos y chañar

Anexo 2: Caracterización morfológica de frutos de olivo y chañar de diferentes localidades

Anexo 3: Perfiles genéticos de electroforesis

Anexo 4: Secuencias de ADN de Olivo y Chañar

Anexo 5: Publicaciones Científicas

Anexo 6: Resumen Ejecución Financiera del proyecto