

Marcadores moleculares asociados a genes/QTLs de resistencia para factores bióticos en nuevas variedades de papa (*Solanum tuberosum* L.) de Bolivia

S. Veramendi, M. Baldelomar, A. Terán, J. Gabriel¹

Resumen

Con el objetivo de asociar genes/QTLs de resistencia a los virus PVY, PVX, a los nematodos (*Globodera pallida* y *G. rostochiensis*), al tizón (*Phytophthora infestans*) y a la verruga (*Synchytrium endobioticum*) en 20 variedades de papa, incluida la variedad Waych'a como control susceptible, se evaluaron siete marcadores moleculares para SCAR, CAPS y PCR. Los resultados mostraron que el alelo del marcador RySC3 co-localizado con el gen Ryadg de resistencia a PVY, fue observado en todas las variedades evaluadas. El alelo para el marcador CP60 co-localizado con el gen Rx1 para resistencia a PVX, fue observado en todas las variedades excepto en Chota Ñawi. El alelo para el marcador HC co-localizado con el gen/QTL Rgp5-vrnHC para resistencia a *G. pallida*, fue observado en las variedades Aurora, Chota Ñawi, Isabel, Keila, Morita, P'alta Chola, Pujoyuni imilla, Robusta, Rosada, Victoria, Violeta, Yungueñita, Jaspe e India. El alelo para el marcador Gro1-4 co-localizado con el gen Gro1-4 para resistencia a *G. rostochiensis*, fue observado en las variedades Chota Ñawi, Isabel, Keila, Victoria, Violeta, Jaspe e India. El alelo para el marcador GP94 co-localizado con el gen/QTL Rpi-phu 1 para resistencia a *P. infestans*, fue observado en todas las variedades. Finalmente el alelo para el marcador NL25 co-localizado con el gen Sen1 para resistencia a *S. endobioticum*, fue también observado en todas las variedades.

Palabras claves adicionales:

Genes, virus, nematodos, tizón, verruga.

¹ Investigadores de la Fundación PROINPA, C.P. 4285, Cochabamba, Bolivia. E-mail: j.gabriel@proinpa.org

Aceptado para publicación: Noviembre 30, 2011

Molecular markers associated with genes/QTLs for resistance to biotic factor in new potato (*Solanum tuberosum* L.) varieties from Bolivia

Summary

With the objective of associating genes/QTLs for resistance to viruses PVY, PVX, the nematodes *Globodera pallida* and *G. rostochiensis*, late blight (*Phytophthora infestans*) and the wart (*Synchytrium endobioticum*) in 20 potato varieties, including the variety Waych'a as susceptible control, seven molecular markers were validated for SCAR, CAPS and PCR. The results showed that the marker allele RySC3 co-localized with the Ry_{adg} gene for resistance to PVY was observed in all the varieties tested. The allele for the marker CP60 co-located with the Rx1 gene for resistance to PVX, was observed in all varieties, except in Chota Ñawi. The allele for the marker HC co-localized with the RGp5-vrnHC gene/QTL for resistance to *G. pallida*, was observed in Aurora, Chota Ñawi, Isabel, Keila, Morita, P'alta Chola, Pujyuni imilla, Robusta, Rosada, Victoria, Violeta, Yungueña, Jaspe, India, and Pinta Boca (stn) varieties. The marker allele Gro1-4 co-localized with the gene Gro1-4 for resistance to *G. rostochiensis*, was observed in Chota Ñawi, Isabel, Keila, Victoria, Violeta, Jaspe, and India and Wallpa Ningri (stn) varieties. The marker allele GP94 co-localized with the Rpi-phu 1 gene/QTL for resistance to *P. infestans*, was observed in all varieties. Finally the marker allele NL25 co-localized with the Sen1 gene for resistance to *S. endobioticum*, was also observed in all varieties.

Additional key words:

Genes/QTLs, virus, nematodes, late blight, wart.

Introducción

Desde la prehistoria, el hombre ha seleccionado y mejorado especies vegetales, animales y microbianas basándose en el fenotipo. Las mejoras genéticas eran posible gracias a la variabilidad genética, a la heredabilidad del carácter que se quería aislar, a la eficacia e intensidad de la selección aplicada, y al tiempo necesario para realizar un ciclo de selección. Sin embargo, quedan muchos aspectos desconocidos, como son en muchos casos el número exacto y efecto de los genes implicados en la expresión de un carácter y sus interacciones, así como la localización de estos genes, y el análisis de su función fisiológica (Gabriel, 2008).

Los avances en la biología molecular y, particularmente, en la genómica y proteómica permiten aplicar nuevas estrategias y técnicas eficientes para el detallado análisis genético de cualquier fenotipo. Los marcadores moleculares constituyen la herramienta básica para los fines mencionados. Los marcadores son elementos discriminativos que permiten distinguir y clasificar objetos.

Afortunadamente, la aparición de los marcadores moleculares está ayudando a eliminar tanto los inconvenientes de una selección basada en el análisis exclusivo del fenotipo, como la identificación de especies y variedades de una forma más rigurosa y repetitiva. Los marcadores moleculares son biomoléculas que se pueden relacionar con un rasgo genético. Éstas pueden ser marcadores moleculares como las proteínas (antígenos e isoenzimas) y el ADN (de genes conocidos o fragmentos de secuencia y función desconocida).

Las plagas y enfermedades son los principales problemas para el cultivo de papa en todo el mundo, sobre todo en las parcelas de los agricultores de escasos recursos en los países menos desarrollados, donde la certificación de cultivos y la protección química no son generalmente accesibles, y también en la agricultura orgánica en los países industrializados.

El mejoramiento clásico para resistencia a plagas y enfermedades consiste en la identificación de fuentes de resistencia, que a menudo se encuentran en el germoplasma silvestre, la introgresión de factores de resistencia en variedades por retrocruzamiento recurrente a diferentes clones de *Solanum tuberosum*, ha generado progenies y clones resistentes (Ross, 1986). En las últimas dos décadas, varios de estos factores de resistencia se han co-localizado en el mapa genético de la papa utilizando marcadores moleculares en base al DNA. Se han identificado genes mayores (genes R), así como loci de resistencia cuantitativa (QTL) (Gebhardt y Valkonen, 2001). El conocimiento de la posición en el mapa genético está estrechamente vinculado con marcadores basados en DNA que facilita ahora la localización y permite combinar los factores de resistencia de diferentes fuentes, utilizando como genotipos resistentes a los padres de las poblaciones de origen correspondiente.

Ritter *et al.* (2005) menciona que en los mapas genéticos de la papa se han integrado caracteres cualitativos como resistencia monogénica a PVY (Ry_{sto} , Brigneti *et al.*, 1997, Ry_{adg} , Hämäläinen *et al.*, 1997), PVX ($Rx1$, $Rx2$, Ritter *et al.*, 1991; Nb , De Jong *et al.*, 1997, Nx_p , Tommiska *et al.*, 1998), nematodos ($Gro1$, Barone *et al.*, 1990, $H1$, Gebhardt *et al.*, 1993, $Gpa1$, Kreike *et al.*, 1994, $Gpa2$, Rouppe van der Voort *et al.*, 1997, $Gpa5$, Rouppe van der Voor *et al.*, 2000) y *P. infestans* ($R1$, Leonards-Schippers *et al.*, 1994, $R3$, El-Kharbotly *et al.*, 1994, $R2$, Li *et al.*, 1998, $R6$ y $R7$, El-Kharbotly *et al.*, 1996).

El virus de la papa (PVY, género Potyvirus) es uno de los patógenos virales más importantes de la papa cultivada. Se ha identificado un solo gen dominante de resistencia extrema (RE) Ry_{adg} a PVY, ha sido identificado en *S. andigena* (Muñoz *et al.*, 1975), que se encuentra en el cromosoma XI de papa (Hämäläinen *et al.*, 1997). El gen Ry_{adg} está estrechamente vinculada a una familia de genes con una alta homología de secuencia con el gen N del tabaco que le confiere resistencia al virus del mosaico del tabaco (Leister *et al.*, 1996; Vidal *et al.*, 2002). El gen N es el prototipo de los genes de resistencia de la familia de las solanáceas que tienen en común la unión de

nucleótidos (NB) y un dominio de repeticiones ricas en leucina (LRR) dominante (Whitham *et al.*, 1994; Leister *et al.*, 1996; Hämäläinen *et al.*, 1997; Hehl *et al.*, 1999; Vidal *et al.*, 2002). Basados en el polimorfismo de resistencia del gen (RGL) se observó que está ligada al locus $R_{y_{adg}}$ (Sorri *et al.*, 1999; Kasai *et al.*, 2000). Al mismo tiempo se observó que funciona como un marcador para el gen Na_{adg} que está estrechamente ligada a $R_{y_{adg}}$ en el mismo grupo de genes (Hämäläinen *et al.*, 1997), Na_{adg} tiene un control hipersensitivo eficiente.

Los nematodos del quiste de raíz de la papa, *Globodera rostochiensis* y *Globodera pallida* son patógenos importantes del suelo en muchos países del mundo, y la incorporación de la resistencia a los *G. rostochiensis* es necesaria para la liberación de nuevas variedades de papa. Muchos factores de resistencia han sido introducidos en el pasado dentro de clones y variedades de *S. andigena*, *S. vernei* y *S. spengazzinii* (Ross, 1986). El gen dominante Gro1 da resistencia a todos los patotipos conocidos de *G. rostochiensis*, probablemente se originó a partir de *S. spengazzinii* y fue co-localizado en el cromosoma VII de papa (Barone *et al.*, 1990). Gro1 probablemente es idéntico al gen Fb descrito por primera vez por Ross (1962). A nivel molecular, el locus Gro1 consiste en una familia de genes de tipo NB-LRR agrupados. Uno de los miembros de esta familia, Gro1-4, demostró que confiere resistencia a *G. rostochiensis* patotipo Ro1 (Paal *et al.* 2004). Genes mayores (genes R) para RE para el virus X de la papa (PVX, género Potexvirus) fueron identificados en clones diploides y los genes dominantes Rx1 y Rx2 fueron mapeados en los cromosomas XII y V de papa, respectivamente (Ritter *et al.*, 1991). El origen de Rx1 y Rx2 no está claro. RE a PVX se ha introducido de *S. andigena* y *S. acaule* (Ross, 1986). Lo más probable es que Rx1 corresponda al gen $R_{y_{adg}}$ de *S. andigena*, mientras que Rx2 corresponde al gen $R_{x_{acl}}$ de *S. acaule* (Ritter *et al.*, 1991).

Sliwka *et al.* (2010) desarrollaron el marcador GP4 para detectar el gen Rpi-phu1 que confiere resistencia al tizón (*Phytophthora infestans*), que está ubicado en el cromosomas IX, la cual probablemente proviene de *S. phureja*.

Gebhardt *et al.* (2006), describieron el ligamiento de los marcadores basados en PCR para la combinación de los marcadores del gen Ry_{adg} para resistencia extrema a PVY con Gro1 para resistencia a los nematodos y con Rx1 para resistencia extrema a PVX, o con Sen1 para resistencia a verruga (*Synchytrium endobioticum*). Los clones resultantes mostraron tener varios rasgos de resistencia a los patógenos mencionados.

En el presente estudio se describe la validación de marcadores moleculares asociados con la resistencia a tizón tardío (*Phytophthora. Infestans*), al nematodo-quiste (*Globodera pallida* y *G. rostochiensis*), a los virus PVX y PVY y a la verruga (*Synchytrium endobioticum*), con el objetivo de confirmar la resistencia reportada en las variedades evaluadas (Gabriel, 2010; Gabriel *et al.*, 2011), así como identificar parentales potenciales, que serán utilizados en futuros cruzamientos y en la selección asistida por marcadores moleculares (SAM) en nuevas poblaciones segregantes.

Materiales y Métodos

Material biológico. En invernadero fueron sembradas 20 variedades de papa (Tabla 1) provenientes del programa de mejoramiento genético de papa de la Fundación PROINPA (Gabriel *et al.*, 2011), incluyendo la variedad Waych'a (*Solanum andigena*) como control susceptible, que es una de las más cultivadas en Bolivia. Como controles resistentes se utilizaron a las variedades nativas: Papa Rosa (adg); Pinta Boca (stn); Wallpa Ningri (stn); para el marcador RySC3, HC y Gro 1-4 respectivamente; y P'alta Chola para los marcadores GP94, NL25 y CP60.

QTLs y genes de resistencia conocidos. En la Tabla 2 se describe los QTLs y genes de resistencia a tizón (*P.infestans*), nemátodo – quiste (*Globodera rostochiensis*, *G. pallida*), PVY, PVX y verruga (*Synchytrium endobioticum*) recopilados en los

12 cromosomas, intervalo de marcadores flanqueantes (MF) para cada gen/QTL y la respectiva referencia bibliográfica.

Tabla 1. Lista de 20 variedades de papa y sus atributos de resistencia descritas por Gabriel *et al.* (2011)

| Variedad | Genealogía | | Resistencias |
|----------------|-------------------------|-----------------------|---------------|
| | Hembra | Macho | |
| Aurora | India | Waych'a | tiz, ver, vir |
| Chota Ñawi | 380073.2 | [(sto x pls)] | tiz, vir |
| Desiréé | Urgenta (tbr) | Depesche (tbr) | pre |
| India | US 136.6 | [3345D(1) x 2288A(2)] | tiz, vir, glo |
| Isabel | 82-222-2 | Jaspe | tiz, ros, |
| Jaspe | (sto x pls) | (tbr x phu) | tiz, ros, vir |
| Keila | 82-222-2 | Jaspe | tiz, ros, |
| Morita | 82-222-2 | India | tiz, ver, vir |
| P'alta Chola | India | Robusta | tiz, ver, vir |
| Pafrita | Perla | Desiréé | tiz, pre |
| Pinker | <i>Solanum fendleri</i> | Desiréé | tiz, pre |
| Puyjuni Imilla | India | Waych'a | tiz, ver, vir |
| Robusta | (tbr x adg) | tbr | tiz, vir |
| Rosada | (iop-phu) | Sani Imilla (adg) | tiz, vir |
| Runa Toralapa | tbr (I-1058) | adg (700764) | tiz, ver, seq |
| Salomé | India | (phu + gon) | tiz |
| Victoria | 86-40-3 | Puquina (720049) | tiz, vir, hel |
| Violeta | [Robusta x 82-3-5] | [Robusta x 82-3-5] | tiz, ver, vir |
| Yungueñita | O.P. Yungay | | tiz, vir |
| Waych'a | <i>Solanum andigena</i> | | Nativa |

tiz = *Phytophthora infestans*, ver = *Synchytrium endobioticum*, vir = PVY, pre = Precocidad, glo = *Globodera pallida*, seq = Sequía, hel = Heladas. 82-222-2 = (tbr x adg) x adg, 86-40-3 = tbr x adg, Puquina = (ajh x phu) x tbr.

Tabla 2. QTLs y genes de resistencia a tizón, nematodo – quiste, PVY, PVX y verruga recopilados en los 12 cromosomas, intervalo de marcadores flanqueantes (MF) para cada QTL/gen

| Nº | Crom | Gen/QTL | MF | Factor | Referencia |
|----|------|------------|--------|-----------------------------------|----------------------------------|
| 1 | V | RGp5-vrnHC | HC | <i>G. pallida</i> | Sattarzadeh <i>et al.</i> (2006) |
| 2 | VII | Gro 1-4 | Gro1-4 | <i>G. rostochiensis</i> | Gebhardt <i>et al.</i> (2006) |
| 3 | VIII | RB | RB | Tizón (<i>P. infestans</i>) | Colton <i>et al.</i> (2006) |
| 4 | IX | Rpi-phu1 | GP94 | Tizón (<i>P. infestans</i>) | Sliwka <i>et al.</i> (2010) |
| 5 | XI | Sen1 | NL25 | Verruga (<i>S. endobiotium</i>) | Bormann (2004) |
| 6 | XI | Ryadg | RYSC3 | PVY | Gebhardt <i>et al.</i> (2006) |
| 7 | XII | Rx1 | CP60 | PVX | Bendahmane <i>et al.</i> (1997) |

Crom = cromosoma; MF = marcadores flanqueantes

Tabla 3. Secuencias de los cebadores utilizados para amplificar los correspondientes marcadores en las variedades para el cribado de QTL/genos conocidos

| Marcador | Cebador directo | Cebador reverso | T° A (°C) | Tamaño | Protocolo |
|----------|--------------------------------|-----------------------------------|-----------|--------|-----------|
| HC | ACACCACCTGTTTGATAAAAAACT | GCCTTACTTCCCTGCTGAAG | 58 | 276 | PCR |
| Gro1-4 | TCTTTGGAGATACTGATTCTCA | CGACCTAAAATGAAAAGCATCT | 60 | 602 | PCR |
| RB | CACGAGTGCCCTTTTCTGAC | ACAATTGAATTTTTAGACTT | 50 | 213 | PCR |
| GP 94 | ATGTATCACAATCACATTCTTGCTC | TGTAAAACCAACAAGTAGTGTGC | 56 | 350 | PCR |
| NL-25 | TAT TGT TAA TCG TTA CTC CCT C | AGA GTC GTT TTA CCG ACT CC | 58 | 1000 | CAPS |
| RYSC3 | ATA CAC TCA TCT AAA TTT GAT GG | AGG ATA TAC GGC ATC ATT TTT CCG A | 58 | 320 | SCAR1 |
| CP60 | CAGCCTACCGCGAAAAGTGCTTCG | GCCAACCCACGAGTTTCTCACTGAC | 56 | 350 | CAPS |

¹SCAR = Sequence Characterized Amplified Region (*Secuencia caracterizada de la región amplificada*)

²CAPS = Cleaved Amplified Polymorphic Sequence (*Secuencia polimórfica amplificada y cortada*)

Técnicas moleculares

Extracción de ADN. Se colectaron foliolos tiernos y sanos de las variedades de papa, provenientes de invernadero, debidamente identificadas y almacenadas en freezers a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para luego ser molidas en nitrógeno líquido (-195°C) hasta obtener un polvo fino, del que se utilizó 100 mg para el proceso de extracción de ADN genómico mediante el protocolo de CTAB 2X (hexadecil bromuro de trimetil amonio) según Doyle y Doyle (1990).

Cuantificación de ácidos nucleicos. La cuantificación de ADN genómico, se realizó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1%, que fue cargado a los pocillos formados en el gel. Estas muestras migraron durante 45 min en cubetas de electroforesis a una potencia de 70 V (5v/Cm) y visualizado a través de un transluminador UV marca Biorad. La calidad y concentración del ADN genómico extraído se valoró por comparación de intensidad con las bandas del marcador de peso molecular de concentración conocida (10000 bp Eurogentec).

Análisis de marcadores. Se han utilizado diferentes marcadores que han sido compendiados en una lista de marcadores potenciales que están ligados y co-localizados con gen/QTLs para *P. infestans*, *G. pallida*, *G. rostochiensis*, *S. endobioticum*, PVX y PVY en un mapa referencial de papa (Ritter *et al.*, 2005; Ritter *et al.*, 2008). La Tabla 3 muestra los marcadores utilizados en la presente investigación.

Condiciones de la PCR. Unos 15 μL de mezcla conteniendo 4 ng de DNA Molde, 1X de Tampón PCR 10X, 0,2 mM dNTP, 1 pmol/ μL de cada iniciador y 0,025 U/ μL de la enzima Tag polimeraza fue usado. El programa de amplificación fue realizado en un termociclador (modelo PTC-100, MJ Research, Ramsey, Minnesota, USA), que consistió en un tiempo de

desnaturalización inicial de 5 min del DNA a 94°C, una desnaturalización de 94°C por 1 min, una temperatura de anillamiento, 35 ciclos a 94°C por 1 min, X°C por 45 s, y 72°C por 5 min. Subsecuentemente, Los productos de amplificación fueron visualizados y cuantificados mediante electroforesis en geles de agarosa al 1.8%, con 5 µL del producto PCR y 0.5 µL de tampón de cargado y se aplicó una corriente de 5V/cm.

Los marcadores CAPS se evaluaron inicialmente mediante PCR y posteriormente se procedió a la digestión del producto de amplificación utilizando unos 20 µL de mezcla conteniendo 5 ng/µL de DNA Molde, Buffer ER 10X, BSA 10 µg/µL, y 10u/µL de la enzima Ddel. Los productos digeridos se separaron por electroforesis en gel de agarosa al 2% preparado con 2 g de agarosa, 100 mL de TBE 1X. La muestra se preparó con 10 µL del producto digerido y 2 µL de tampón de carga. Los geles se visualizaron en el transluminador marca Biorad.

Análisis de alelos. La presencia o ausencia de cada marcador molecular validado en cada variedad, se anotó y almacenó en archivos con formato EXCEL para su posterior análisis.

Resultados

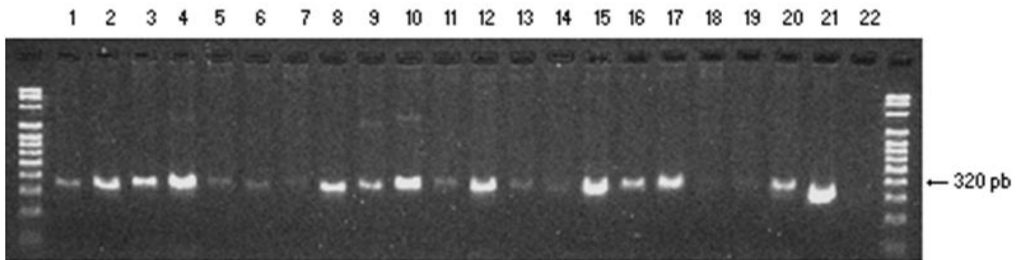
Para detectar los genes de resistencia a PVY, PVX, nematodo – quiste (*G. rostochiensis*, *G. pallida*), verruga (*S. endobioticum*) y tizón (*P. infestans*), se analizaron las bandas por la presencia/ausencia de los alelos en los geles de electroforesis, los mismos que fueron anotados en una hoja electrónica de Excel.

El análisis realizado mostró que el alelo para el marcador RySC3 co-localizado con el gen Ry_{adg} para resistencia a PVY en el cromosoma XI a 320 pb (Gebhardt *et al.*, 2006), fue observado en todas las variedades (Tabla 4 y Figura 1), no así

Tabla 4. Presencia/ausencia de alelos (QTIs/genes) resistentes en las variedades evaluadas, las mismas que se han identificado a través de la utilización de marcadores moleculares

| Nº | Variedad | PVY | G. p. | G. r. | P.i. | S. e. | PVX |
|----|----------------|-------|-------|---------|-------|-------|-------|
| | | RySC3 | HC | Gro 1-4 | GP 94 | NL 25 | CP 60 |
| 1 | Aurora | + | + | - | + | + | + |
| 2 | Chota Nawi | + | + | + | + | + | - |
| 3 | Desireé | + | - | - | + | + | + |
| 4 | Isabel | + | + | + | + | + | + |
| 5 | Runa Toralapa | + | - | - | + | + | + |
| 6 | Keila | + | + | + | + | + | + |
| 7 | Morita | + | + | - | + | + | + |
| 8 | Pafrita | + | - | - | + | + | + |
| 9 | P'alta Chola | + | + | - | + | + | + |
| 10 | Pinker | + | - | - | + | + | + |
| 11 | Puyjuni Imilla | + | + | - | + | + | + |
| 12 | Robusta | + | + | - | + | + | + |
| 13 | Rosada | + | + | - | + | + | + |
| 14 | Salomé | + | - | - | + | + | + |
| 15 | Victoria | + | + | + | + | + | + |
| 16 | Violeta | + | + | + | + | + | + |
| 17 | Yungueñita | + | + | - | + | + | + |
| 18 | Jaspe | + | + | + | + | + | + |
| 19 | Waych'a C- | - | - | - | - | - | - |
| 20 | India | + | + | + | + | + | + |
| 21 | C+ | Pro | Pbo | Wni | P Ch | P Ch | P Ch |
| 22 | C- | | | | | | |

Papa Rosa = Pro (adj), Pinta Boca = Pbo (stn), Wallpa Ningri = Wni (stn), PCh = P'alta Chola, + = Presencia del alelo de resistencia, - = Ausencia del alelo de resistencia, C+ = Control positivo (Resistente), C- = Control negativo (Susceptible).



1. Aurora, 2. Chota Ñawi, 3. Desirée, 4. Isabel, 5. Runa Toralapa, 6. Keila, 7. Morita, 8. Pafrita, 9. P'alta Chola, 10. Pinker, 11. Puyjuni Imilla, 12. Robusta, 13. Rosada, 14. Salome, 15. Victoria, 16. Violeta, 17. Yungueñita, 18. Jaspe, 19. Waych'a C-, 20. India, 21. Papa Rosa C+, C- (de reacción).

Figura 1. Detección del gen Ryadg, utilizando el marcador RySC3 en variedades de papa mejorada (*Solanum tuberosum*), representada por el fragmento de 320 pb

en la variedad Waych'a que es utilizada como control negativo (C-), donde no se observó la banda del alelo de resistencia, en cambio la variedad nativa Papa Rosa (adg) que es el control positivo (C+) si mostró el alelo.

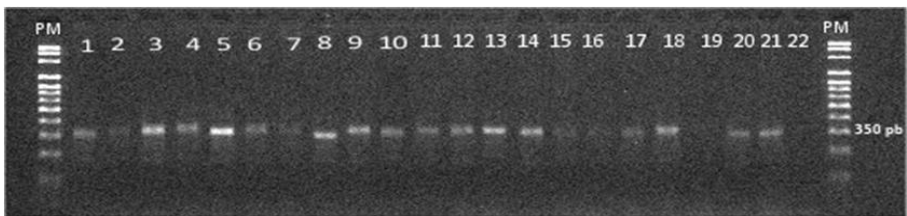
El alelo para el marcador CP60 co-localizado con el gen Rx1 para resistencia a PVX, ubicado en el cromosoma XII a 350 pb (Bendahmane *et al.*, 1997), fue observado en todas las variedades con excepción de Chota Ñawi (Tabla 4).

El alelo para el marcador HC co-localizado con gen/QTL RGP5-vrnHC para resistencia a *G. pallida*, ubicado en el cromosoma V a 276 pb (Sattarzadeh *et al.*, 2006), no se detectó en las variedades Desirée, Runa Toralapa, Pafrita, Pinker, Salomé y Waych'a (Tabla 4). Todas las demás variedades si mostraron el alelo de resistencia, incluyendo el control positivo nativo Pinta Boca (stn).

El alelo para el marcador Gro1-4 co-localizado con el gen Gro1-4 para resistencia a *G. rostochiensis* en el cromosoma VII a 602 pb (Gebhardt *et al.*, 2006), fue observado en las variedades Chota Ñawi, Isabel, Keila, Victoria, Violeta, Jaspe e India y en el

control positivo nativo Wallpa Ningri (stn). Todas las demás variedades no mostraron el alelo de resistencia (Tabla 4).

El alelo para el marcador GP94 co-localizado con el gen/QTL Rpi-phu 1 para resistencia a *P. infestans* en el cromosoma IX a 350 pb (Sliwka *et al.*, 2010), se detectó en todas las variedades, con excepción de Waych'a que es el control Susceptible C- (Tabla 4 y Figura 2).



1. Aurora, 2. Chota Ñawi, 3. Desireé, 4. Isabel, 5. Runa Toralapa, 6. Keila, 7. Morita, 8. Pafrita, 9. P'alta Chola, 10. Pinker, 11. Puyjuni Imilla, 12. Robusta, 13. Rosada, 14. Salome, 15. Victoria, 16. Violeta, 17. Yungueñita, 18. Jaspe, 19. Waych'a C-, 20. India, 21. Palta Chola C+, 22. C- (de reacción).

Figura 2. Detección del gen Rpi-phu 1, utilizando el marcador GP 94 en variedades de papa mejorada (*Solanum tuberosum*), representada por el fragmento de 350 pb

Finalmente el alelo para el marcador NL25 co-localizado con el gen Sen1 para resistencia a *S. endobioticum* en el cromosoma XI a 1000 pb (Sliwka *et al.*, 2010), se detectó en todas las variedades evaluadas a excepción de Waych'a que no mostró la presencia del alelo (Tabla 4).

Discusión

En el presente estudio se validaron marcadores moleculares co-localizados con genes de resistencia a los virus PVY, PVX, al nematodo-quiste (*G. pallida*, *G. rostochiensis*), al tizón (*P. infestans*) y la verruga (*S. endobioticum*) en los cromosomas, XI, XII, V, VII, IX, XI y VIII respectivamente. Estos marcadores fueron validados en nuevas variedades de papa obtenidas de la

combinación de diversas especies cultivadas y silvestres de papa (Gabriel *et al.*, 2011). Las especies cultivadas utilizadas en los cruzamientos involucraron a *Solanum andigena* (4x), *S. tuberosum* (4x), *S. goniocalyx* (2x), *S. phureja* (2x) y *S. ajanhuiri* (2x), y a las especies silvestres *S. stoloniferum* (4x), *S. iopetalum* (6x), *S. palustre* (2x), *S. fendleri* (2x).

Los resultados mostraron que los marcadores moleculares utilizados para asociar los genes de resistencia a múltiples factores fue un método eficiente para asociar con los rasgos de resistencia en las variedades evaluadas. La utilización de los marcadores ligados a los cinco loci mayores de resistencia: HC, Gro 1-4, NL25, RYSC3 y CP60 lograron asociarse con los genes de resistencia RGp5-vrnHC, Gro 1-4, Sen1, Ryadg y Rx1 respectivamente.

Se debe mencionar que la resistencia al virus PVY y la verruga (*S. endobioticum*) es simple y está gobernada por genes R mayores que le confiere un tipo de resistencia monogénica (Mendoza *et al.*, 1996; Mihovilovich *et al.*, 1998; Fernández – Northcote, 1991). Esto se reflejó cuando se encontró que las 20 variedades o sea el 100% mostró la presencia del alelo de resistencia a PVY, probablemente proveniente de las especies de *S. andigena* y/o *S. stoloniferum* (Fernández-Northcote, 1981) utilizados en la generación de las nuevas variedades evaluadas. Una experiencia reciente en la que se utilizó el marcador RYSC3 para la detección del gen Ry_{adg}, de un total de 71 progenitores de papa analizados, 30 mostraron algún tipo de resistencia a PVY y 17 fueron portadores del marcador; además este marcador fue utilizado para SAM en 499 progenies provenientes de diferentes cruzamiento, mostrando un 99.7% en la eficacia de detección del gen Ry_{adg} (Sagredo *et al.*, 2009).

Respecto de la herencia a PVX se menciona que es monogénica y se han reportado genes dominantes de hipersensibilidad Nx_{tbr} y Nb_{tbr} que han sido introducidos en diversos cultivares europeos y estadounidenses, especialmente el Nx_{tbr} (Ross, 1986). El gen Nb_{tbr} ha sido detectado en diversas especies como *S. andigena*, *S. acaule*, *S. vernei*, *S. tuberosum*, *S. sparsipilum*, *S. chacoense*, *S. microdontum*, *S. etuberosum* y

S. pinatisectum (Rizvi, 1983; Fernández-Northcote, 1991). En el presente estudio 18 de las 20 variedades evaluadas, es decir el 80% mostraron el alelo de resistencia a este virus, que probablemente proviene de la especie *S. andigena* y *S. palustre* (antes llamado *S. vernei*), utilizadas en la generación de estas variedades.

En el caso de la verruga (*S. endobioticum*) se observó que todas las variedades evaluadas, es decir el 100% mostraron el alelo de resistencia, probablemente proveniente de la especie cultivada *S. andigena*. Este carácter está gobernado por un gene dominante y fue detectado en el cromosoma XI en una posición similar al gen Ry_{adg} (Helh *et al.*, 1999) y el gen Sen1 está ligado a genes homólogos N.

Se debe mencionar que la utilización de cualquier marcador para SAM para caracteres monogénicos resulta sencillo, pero se debe poner a punto las técnicas, encontrando sus temperaturas de anillamiento apropiadas y ver si genera polimorfismo en las poblaciones genotipadas, lo cual lleva tiempo, recurso y trabajo. Esto requerirá de la automatización del proceso.

En el caso del nematodo del quiste el análisis de la resistencia se complica porque estos son caracteres poligénicos gobernados por genes menores de herencia cuantitativa (Ross, 1996). En el presente estudio se observó que 14 de las 20 variedades evaluadas, es decir el 70% mostraron el alelo de resistencia para *G. pallida* y 7 de las 20 variedades, es decir el 35% mostraron el alelo de resistencia a *G. rostochiensis*. Esto, está indicando la complejidad de la resistencia de *G. rostochiensis* en referencia a *G. pallida*. Esta resistencia aparentemente está vinculada a la especie *S. palustre* (antes *S. vernei*) y *S. andigena*, que fueron reportadas como resistentes por Ross (1996) y que fueron utilizadas en las cruzas para obtener las variedades evaluadas.

La herencia de la resistencia a tizón (*P. infestans*) es compleja y gobernada por muchos genes (poligénica) tal como lo indicaron Wastie (1991) y Ross (1996). Sin embargo, estudios realizados

por Colon *et al.* (1995) observaron resistencia parcial conferida por genes R provenientes de especies silvestres como *Solanum arnezii*, *S. holdelmanni*, *S. leptophyes*, *S. berthaultii* y *S. microdontum*. En cambio, Gabriel *et al.* (2011), reportaron resistencia parcial al tizón conferida por genes menores en cruza realizadas entre especies silvestres como *S. okadae*, *S. canacense*, *S. bukasovii*, *S. jamessii* and *S. raphanifolium* con especies cultivadas de *S. phureja* y *S. goniocalyx*.

En el presente estudio todas las variedades mostraron tener la banda del alelo de resistencia a esta enfermedad. Esta resistencia probablemente fue conferida de las especies de *S. andigena*, *S. phureja*, *S. iopetalum*, *S. fendleri* y *S. stoloniferum*, utilizados en la generación de las nuevas variedades. Sin embargo, se debe mencionar que se observó que la variedad Desirée mostró el alelo de resistencia al tizón. Esta variedad es susceptible al tizón en follaje, pero fue reportada con la más alta resistencia en tubérculo (Baarveld *et al.*, 2003). Esto está indicando que la resistencia de hoja y tubérculo son eventos independientes gobernados por genes diferentes, tal como fue observado en otros estudios (Collins *et al.*, 1999; Oberhagemann *et al.* 1999; Gabriel *et al.* 2009). Aparentemente, en el presente estudio la banda del alelo observado está asociada con los genes de resistencia a tizón en tubérculo.

El marcador RB utilizado para detectar el gen de resistencia a tizón (RB) no fue observado en ninguna de las variedades evaluadas, probablemente debido a que éstas no tienen los genes de *S. bulbocastanum* que es la especie en la cual se ha identificado este gen de resistencia esto estaría indicando que posiblemente el marcador es específico para este gen. (Colton *et al.*, 2006)

Un ensayo PCR realizado con genotipos provenientes de la crusa entre *S. phureja* y *S. bulbocastanum* con el propósito de verificar la presencia del gen RB amplificó el fragmento que se esperaba a 213 pb (resultados no publicados).

Se debe resaltar que las variedades nativas Papa Rosa (adg), Pinta Boca (stn), Wallpa ningri (stn) mostraron ser testigos positivos para los marcadores moleculares RySC3, HC y Gro 1-4, que están asociados a los genes de resistencia a PVY, *G. pallida* y *G. rostochiensis*. Indicando esto que estas especies son una nueva fuente de resistencia genética.

Se debe enfatizar que sólo se puede diferenciar genes/QTL seleccionables. Esto requiere que tanto el marcador sea polimórfico, como que la configuración alélica del gen/QTL sea apropiada.

Es notorio observar que existen marcadores indirectos y directos. En los marcadores indirectos hay ciertas distancias entre el marcador y un gen de interés y puede haber recombinaciones. A este tipo de marcadores pertenecen los SSRs que son muy polimórficos pero se pueden también seleccionar “falsos alelos”, debido a las recombinaciones. Esto requiere aumentar el número de SSRs disponibles.

En cambio, los marcadores directos permiten la identificación directa de los alelos de un gen de interés y se pueden aplicar independientes del entorno genético, son normalmente derivados de regiones codificantes (coding regions) como ESTs, TDFs, utilizando diferentes técnicas moleculares. Los genes candidato son interesantes en este sentido, pero tienen la desventaja de que no son tan polimórficos como los SSRs.

Por otra parte, existen varias aplicaciones prácticas para genes candidatos detectados como análisis de su diversidad alélica, transformación genética o referencias cruzadas a través de la integración en mapas de ligamiento. Los estudios de diversidad alélica en diferentes germoplasmas pueden permitir asociar variantes alélicas específicas con un genotipo particular detectar los alelos más efectivos y de esta manera proporcionar marcadores útiles para la selección asistida (SAM).

Agradecimientos

Se agradece el financiamiento recibido de los proyectos: "Fortaleciendo capacidades de innovación participativa para luchar contra la pobreza rural" (IP – Holanda) y Fontagro - CLIPAPA (FTG/RF-1025-RG). Gracias al Dr. José I. Ruiz de Galarreta por la revisión y sugerencias al presente documento y al Dr. José A. Castillo y a la M.Sc. Ximena Cadima por facilitarnos el uso del laboratorio de Biología Molecular.

Literatura Citada

Baarveld, H.R.; H.M.G. Peeter; E. Shipper; J.K. Shipper; J.Delleman. 2003. Netherlands catalogue of potato varieties. NIVAP, The Netherlands. 263 p.

Barone, A.; E. Ritter; U. Schachtschabel; T. Debener; F. Salamini; C. Gebhardt, 1990. Localization by restriction fragment length polymorphism mapping in potato of a major dominant gene conferring resistance to the potato cyst nematode *Globodera rostochiensis*. Mol Gen Genet 224: 177-182.

Bendahmane, A.; K. Kanyuka; D.C. Baulcombe. 1997. High-resolution genetical and physical mapping of the Rx gene for extreme resistance to potato virus X in tetraploid potato. Theor Appl Genet 95: 153—162.

Brigneti, G.; J. García-Mas, D.C. Baulcombe. 1997. Molecular mapping of the potato virus Y resistance locus *Rysto* in potato. Theor Appl Genet 94: 198-203.

Colon, L.; R.Jansen ; D.Budding. 1995. Partial resistance to late blight (*Phytophthora infestans*) in hybrids progenies of four South American *Solanum* species crosses with diploid *S. tuberosum*. Theor Appl Genet 90: 691-698.

Colton, L.; H.Groza; S. Wielgus; J. Jiang. 2006. Marker-Assisted Selection for the Broad-Spectrum Potato Late Blight Resistance Conferred by Gene RB Derived from a Wild Potato Species. Crop Science 46:589-594.

Collins, A.; D. Milbourne; L. Ramsay; R ; C. Chatot-Balandras ; P. Oberhagemann ; W. De Jong ; C. Gebhardt, E. Bonnel; R. Waugh 1999. QTL for field resistance to late blight in potato are strongly correlated with maturity and vigour. *Molecular Breeding* 5 (5): 387-398.

De Jong, W.; A. Forsyth ; D. Leister; C. Gebhardt; D.C. Baulcombe. 1997. A potato hypersensitive resistance gene against potato virus X maps to a resistance gene cluster on chromosome 5. *Theor Appl Genet* 95: 246-252.

Doyle, J.J. ; J.L. Doyle. 1990. A rapid total DNA preparation procedure for fresh plant tissue. *Focus* 12:13-15.

El-Kharbotly, A.; C. Leonards-Schippers ; D.J. Huigen ; E. Jacobsen ; A. Pereira ; W.J. Stiekema ; F. Salamini; C. Gebhardt. 1994. Segregation analysis and RFLP mapping of the *R1* and *R3* alleles conferring race-specific resistance to *Phytophthora infestans* in progeny of dihaploid potato parents. *Mol Gen Genet* 242: 749-754.

El-Kharbotly, A.; C. Palomino-Sánchez; F. Salamini, F. 1996. *R6* and *R7* alleles of potato conferring race-specific resistance to *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary identified genetic loci clustering with the *R3* locus on chromosome XI. *Theor Appl Genet* 92: 880-884.

Fernandez-Northcote, E. 1991. Mejoramiento por resistencia a los principales virus de la papa. *Revista Latinoamericana de la Papa*. 4:1-21.

Fernández-Northcote, E. N.; C.R. Brown; 1981. Resistance in diploid *Solanum phureja*, *S. stenotomun*, and *S. berthaultii* intercroses to potato virus Y. (Abstr.) *Phytopathology* 81:873.

Gabriel, J.; J.I. Ruiz de Galarreta; M. Hernández; G. Plata; L. Barandalla; R. López; E. Ritter. 2009. Aplicación de marcadores moleculares para cribado de QTLs en diferentes fuentes de resistencia a tizón tardío (*Phytophthora infestans*) en papa. *Revista de Agricultura* 45 (61): 36-43.

Gabriel, J. 2008. Aplicación de marcadores moleculares para el cribado de QTLs en diferentes fuentes de resistencia a tizón tardío (*Phytophthora infestans*) en papa. Tesis Doctoral, Universidad Pública de Navarra (UPNA), Pamplona, España. 109 p.

Gabriel, J. 2010. Documento marco: Estrategias y perspectivas del mejoramiento genético de papa (*Solanum tuberosum* L.) en Bolivia. ISBN: 978-99954-743-2-4, Fundación PROINPA, Cochabamba, Bolivia. 60 p.

Gabriel, J.; R. Pereira; A. Gandarillas. 2011. Catalogo de nuevas variedades de papa en Bolivia. ISBN: 978-99954-743-6-2, Fundación PROINPA, Cochabamba, Bolivia. 55 p.

Gabriel, J.; J.I. Ruiz de Galarreta ; R. Lopez-Pardo.; L. Barandalla ; C.Alvarado; E. Ritter. 2011. Short communication. Introgression of late blight (*Phytophthora infestans* L.) resistance from tuber-bearing *Solanum* wild species into cultivated potato. *Spanish J Agric Res* 9 (1): 193-197.

Gebhardt, C.; D. Mugniery; E.Ritter; F. Salamini; E. Bonnel, E. 1993. Identification of RFLP markers closely linked to the *H1* gene conferring resistance to *Globodera rostochiensis* in potato. *Theor Appl Genet* 85: 541-544.

Gebhardt C, Valkonen JPT (2001) Organization of genes controlling disease resistance in the potato genome. *Annu Rev Phytopathol* 39:79–102

Gebhardt, C.; D.Bellin; H. Henselewski; W. Lehmann; J. Schwarzfischer ; J.P.T. Valkonen. 2006. Marker-assisted combination of major genes for pathogen resistance in potato. *Theor Appl Genet* 112: 1458–1464.

Hämäläinen, J.H.; K.N. Watanabe; J.Valkonen; A. Arihara; R.L.Plaisted; E. Pehu; L. Miller, L.; S.A. Slack. 1997 Mapping and marker-assisted selection for a gene for extreme resistance to potato virus Y. *Theor Appl Genet* 94: 192-197.

Hehl, R.; E. Faurie; J. Hesselbach; F. Salamini; S. Whitham; B. Baker; C. Gebhardt. 1999. TMV resistance gene N homologues are linked to *Synchytrium endobioticum* resistance in potato. *Theor Appl Genet* 98:379–386.

Kasai, K.; Y. Morikawa; V.A. Sorri; J.P.T. Valkonen; C. Gebhardt; K.N. Watanabe. 2000. Development of SCAR markers to the PVY resistance gene *Ryadg* based on a common feature of plant disease resistance genes. *Genome* 43:1–8.

Kreike, C.M.; J.R.A de Koning ; J.H. Vinke; J.W. van Oijen; W.J. Stiekema. 1994. Quantitatively inherited resistance to *Globodera pallida* is dominated by one mayor locus in *Solanum spegazzinii*. Theor Appl Genet 88: 764-769.

Leonards-Schippers, C.; W. Gieffer; R. Schäfer-Pregl; E. Ritter ; S. J. Knapp; F. Salamini; C. Gebhardt. 1994. Quantitative resistance to *Phytophthora infestans* in potato: a case study for QTL mapping in an allogamous plant species. Genetics 137: 67-77.

Leister, D.; A.Ballvora; F. Salamini; C. Gebhardt. 1996. A PCR based approach for isolating pathogen resistance genes from potato with potential for wide application in plants. Nat Genetics 14:421-429.

Li, X.; H.J.van Eck.; J.N.A.M. Rouppe van der Voort; D.J.Huigen; P. Stam; E.Jacobsen. 1998. Autotetraploids and genetic mapping using common AFLP markers: the R2 allele conferring resistance to *Phytophthora infestans* mapped on potato chromosome 4. Theor Appl Genet 96: 1121-1128.

Mendoza, H.A.; E.J.Mihovilovich; F. Saguma. 1996. Identification of triplex (YYYy) Potato virus Y (PVY) immune progenitors derived from *Solanum tuberosum* ssp. andigena. Am. Potato J. 73: 13-19.

Mihovilovich, E.J.; L.F. Salazar; F. Saguma; M.W. Bonierbale. 1998. Survey of the durability of extreme resistance to PVY derived from *Solanum tuberosum* ssp. andigena. Páginas 123-128 in CIP program report 1997-1998, Lima Perú.

Muñoz, F.J.; R.L. Plaisted; H.D.Thurston. 1975. Resistance to potato virus Y in *Solanum tuberosum* spp. andigena. Am Potato J 52:107-115.

Oberhagemann, P.; C. Chalot-Balandras; E. Bonnel; R. Schäfer-Pregl; D.Wegener; C. Palomino; F. Salamini; C.Gebhardt. 1999. A genetic analysis of quantitative resistance to late blight in potato: Towards marker assisted selection. Mol Breed 5: 399-415.

Paal, J.; H. Henselewski; J.Muth; K.Meksem; C.M.Menéndez; F. Salamini; A.Ballvora.; C. Gebhardt. 2004. Molecular cloning of the potato Gro1-4 gene conferring resistance to pathotype Ro1 of the root cyst nematode *Globodera rostochiensis*, based on a candidate gene approach. Plant J 38:285-297.

Ritter, E.; J.L.Ruiz de Galarreta; H.J.van Eck; I. Sánchez. 2008. Construction of a potato transcriptome map based on the cDNA-AFLP technique. *Theor Appl Genet* 7 (16): 1003-1013.

Ritter, E.; T. Debener; A.Barone; F.Salamini; C.Gebhardt. 1991. RFLP mapping on potato chromosomes of two genes controlling extreme resistance to potato virus X (PVX). *Mol Gen Genet* 227: 81-85.

Ritter, E.; F.Lucca; I. Sánchez; J.L.Ruiz de Galarreta; A.Aragonés; S.Castañón; G.Bryan; R.Waugh; V. Lefebvre; F. Rousselle-Bourgoise; C. Gebhardt; H. van Eck; H.van Os; J. Taco; J. Bakker, J. 2005. Genomic resources in potato and possibilities for exploitation. *En: Potato in progress* (Eds.: Haverkort AJ & PC Struik), Wageningen Academic Publishers, Holanda, pp 55-64.

Rizvi, S.A.H. 1983. Extreme resistance to potato leafroll virus (PLRV) in seedlings of *Solanum etuberosum* x 5. *pinatisectum* (EP) with 4X chromosomes. *In: Research for the potato in the year 2000*. W.J. Hooker (ed). International Potato Center, 1982. Lima, Perú, p. 162.

Ross, H. 1962. U"ber die Vererbung der Resistenz gegen den Kartoffelnematoden (*Heterodera rostochiensis* Woll.) in Kreuzungen von *Solanum famatinae* Bitt. et Wittm. mit *Solanum tuberosum* L. und mit *S. chacoense* Bitt. *Der Z"chter* 32:74–80.

Ross, H. 1986. *Potato Breeding-Problems and Perspectives*. Verlag Paul Parey, Berlin and Hamburg, 132 p.

Roupe van der Voort, J.; P.Wolters; R. Folkertsma; R. Hutten; P. van Zandvoort; H. Vinke; K. Kanyuka; A.Bendahmane; E. Jacobsen; R. Janssen; J.Bakker. 1997. Mapping of the cyst nematode resistance locus *Gpa2* using a strategy based on comigrating AFLP markers. *Theor Appl Genet* 95: 874-880.

Roupe van der Voort, J.; E.van der Vossen; E. Bakker; H. Overmars; P. van Zandvoort; R. Hutten; R. Klein Lankhorst; J. Bakker. 2000. Two additive QTLs conferring broad spectrum resistance in potato to *Globodera pallida* are localized on resistance gene clusters. *Theor Appl Genet* 101: 1122–30.

Sagredo, B.; M. Matías; C. Barrientos; I. Acuña; J. Kalazich; J. Santos-Rojas. 2009. Evaluation of a scar ryc3 marker of the *Ry_{adg}* gene to select resistant genotypes to *potato virus y* (pv_y) in the INIA potato breeding program. *Ch. J. Agr. Res.* 3 (69): 305 – 315.

Sattarzadeh, A.; U. Achenbach; J. Lübeck; J. Strahwald; E. Tacke; H. Hofferbert; T. Rothsteyn; C. Gebhardt. 2006. Single nucleotide polymorphism (SNP) genotyping as basis for developing a PCR-based marker highly diagnostic for potato varieties with high resistance to *Globodera pallida* pathotype Pa2/3. *Mol Breed* 18:301-312.

Sorri, V.A.; K.N. Watanabe; J.P.T. Valkonen. 1999. Predicted kinase 3a motif of a resistance gene like fragment as a unique marker for PVY resistance. *Theor Appl Genet* 99:164–170.

Sliwka, J.; H. Jakuczun; P. Kamiński; E. Zimnoch. 2010. Marker-assisted selection of diploid and tetraploid potatoes carrying *Rpi-phu1*, a major gene for resistance to *Phytophthora infestans*. *J Appl Genet* 51(2):pp. 133–140.

Tommiska, T.J.; J.H. Hämäläinen; K.N. Watanabe; J.P.T. Valkonen. 1998. Mapping of the gene *Nxphu* that controls hypersensitive resistance to potato virus X in *Solanum phureja* IvP35. *Theor Appl Genet* 96: 840-843.

Vidal, S.; H. Cabrera; R.A. Andersson; A. Fredriksson; J.P.T. Valkonen. 2002. Potato gene Y-1 is an N gene homolog that confers cell death upon infection with Potato virus Y. *Mol Plant Microbe Interact* 15:717–727.

Wastie, R.L. 1991. Breeding for resistance. In: D.D. Ingram and P.H. Williams (eds.). *Phytophthora infestans*, the Cause of Late Blight of Potato. Vol 7. Academic Press, London. pp. 192-224.

Whitham, S.; S.P. Dinesh-Kumar; D. Choi; R. Hehl; C. Corr; B. Baker. 1994. The product of the tobacco mosaic virus resistance gene N: similarity to Toll and the interleukin-1 receptor. *Cell* 78:1101–1115.