

Evaluación de marcadores moleculares asociados con resistencia a gota (*Phytophthora infestans* L.) en papas diploides y tetraploides

Evaluation of molecular markers associated with resistance to late blight (*Phytophthora infestans* L.) in diploid and tetraploid potatoes

Juyó, D. K. *, Gerena, H. N. * y Mosquera, T. **

Resumen

La papa, cultivo de importancia a nivel mundial es gravemente afectado por gota, enfermedad ocasionada por el oomycete *Phytophthora infestans*. Actualmente la forma más efectiva para combatir la enfermedad es mediante el desarrollo de cultivares resistentes al patógeno. Para esto, una estrategia es identificar genes que confieran resistencia al patógeno, para lo cual se buscan marcadores asociados con el carácter de resistencia. En este estudio se evaluaron marcadores moleculares tipo SCAR (*Sequence Characterized Amplified Region*): CosA, GP179, BA47f2 y Prp1 asociados con resistencia a *P. infestans* y el gen de resistencia R1, en 22 cultivares tetraploides pertenecientes a la subespecie *andigena* y cinco especies silvestres. Se evaluó el polimorfismo y se determinó si los alelos polimórficos permitían diferenciar genotipos resistentes de susceptibles. Se comparó el tamaño de los fragmentos obtenidos con los fragmentos esperados asociados con resistencia de acuerdo a reportes. El análisis se realizó considerando presencia/ausencia de los fragmentos: CosA₂₁₀, CosA₂₅₀, R1₁₄₀₀, R1₁₈₀₀, BA47f2₅₀₀, GP179₅₇₀, Prp1₃₀₀, Prp1₆₀₀, y Prp1₉₀₀. Los resultados indicaron que en los cultivares tetraploides y silvestres, se presentaron polimorfismos en todos los marcadores evaluados, con excepción del marcador GP179. No se encontró correlación entre el rasgo de resistencia y los alelos. Los resultados de este estudio muestran que hay repuesta diferencial a los marcadores entre las subsp. *tuberosum* y subsp. *Andigena*.

Palabras clave: *Phytophthora infestans*, resistencia a gota, marcadores diagnóstico, *Solanum tuberosum* subsp. *Andigena*.

Abstract

Potato is an important worldwide crop seriously affected by late blight disease caused by the oomycete *Phytophthora infestans*. Currently, the most effective way to control the disease is developing resistant cultivars to the pathogen by identifying genes that confer resistance to the pathogen. For this purpose it is important to find molecular markers associated with the trait. In this study, the SCAR (*Sequence Characterized Amplified Region*) markers: CosA, GP179, BA47f2 y Prp1, associated with late blight and the resistant gen R1 were evaluated in 22 tetraploid cultivars from subespecie *andigena* and five wild potato species. Polymorphism was evaluated and it was evaluated if polymorphic alleles allow differentiating resistant from susceptible genotypes. The fragment length for each marker was compared to the allele size reported associated to resistance. The analysis considered the presence/absence of the fragments: CosA₂₁₀, CosA₂₅₀, R1₁₄₀₀, R1₁₈₀₀, BA47f2₅₀₀, GP179₅₇₀, Prp1₃₀₀, Prp1₆₀₀ and Prp1₉₀₀. The results indicated that both, tetraploid cultivars and wild potatoes, showed polymorphisms with all these markers, except with the GP179 marker. It was not found correlation between resistance and the presence of specific alleles. Evidence found in this study indicates that results obtained with molecular markers differed between subsp. *tuberosum* and subsp. *andigena*.

Key words: *Phytophthora infestans*, late blight resistance, diagnostic markers, *Solanum tuberosum* subsp. *andigena*.

Recibido: septiembre 22 de 2010 **Aprobado:** octubre 27 de 2011

* Estudiante Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de Colombia.

** Profesora Titular Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de Colombia. tmosquerav@unal.edu.co

Introducción

La papa (*Solanum tuberosum* L.) es considerada el tercer alimento de mayor importancia a nivel mundial (Visser *et al.*, 2009). En el año 2006, Colombia fue catalogado como el tercer productor de papa en América Latina (15 millones de ton anuales) y el vigésimo a nivel mundial (CEVIPAPA, 2008).

La especie tetraploide *Solanum tuberosum* L. ($2n=4x=48$) originaria de los Andes suramericanos, comprende dos subespecies: *tuberosum* y *andigena* (Estrada, 2004). Posiblemente el cruce entre las especies silvestres y diploides, *Solanum stenotomum* y *S. sparpipilum*, dieron origen a *S. tuberosum* subsp. *andigena*, especie precursora de *S. tuberosum* subsp. *tuberosum*, la cual está más adaptada a días largos, condición característica de algunas latitudes europeas y de algunos países suramericanos (Hawkes, 1990a). Esta especie se caracteriza por poseer altos contenidos de aminoácidos esenciales, presenta período vegetativo de tres a cuatro meses y tiempo de reposo del tubérculo corto. El tubérculo es de gran tamaño, tiene yemas superficiales y presenta resistencia parcial a gota (Estrada, 2004).

Los cultivares o híbridos de la subespecie *andigena*, se desarrollan preferiblemente en condiciones de días neutros o cortos y a una altura entre los 2000-4000 msnm (Hawkes, 1990b). Su período vegetativo es de cinco a siete meses, el tubérculo presenta un período largo de reposo, buena calidad para el consumo, alto porcentaje de almidón y resistencia parcial a gota. Estos cultivares son cultivados en la zona andina, en los países de: Bolivia, Colombia, Perú, Ecuador y Venezuela (Estrada, 2004).

La presencia de la enfermedad conocida como gota en Colombia es causada por el oomycete *Phytophthora infestans*, el cual es el patógeno más severo a nivel mundial para este cultivo. La estrategia de control de la enfermedad, adoptada por la mayoría de los agricultores, se basa en el uso y aplicación calendario de una amplia gama de agroquímicos, lo cual constituye cerca del 29,9% de los costos de producción (Agrocadenas, 2005).

La obtención de cultivares resistentes a gota ha sido acogida como una de las principales estrategias para combatir el ataque de esta enfermedad. La resistencia genética en papa es de dos tipos: resistencia de hipersensibilidad, denominada también específica, vertical o monogénica y la resistencia de campo, también denominada parcial, general, horizontal o poligénica (Gebhardt and Valkonen, 2001; Bormann, 2004; Estrada, 2004; Mosquera, 2007). Por un lado,

la primera ha sido utilizada tradicionalmente para conferir resistencia a gota, por cruzamientos de cultivares comerciales con la especie silvestre *Solanum demissum* (L) (Oberhagemann *et al.*, 1999). La segunda, confiere resistencia por disminución de la infección, la tasa de colonización del tejido y reducción de la esporulación. Los genes implicados en resistencia cuantitativa, son identificados mediante el análisis de locus segregantes para caracteres cuantitativos (QTL), en cruzamientos con materiales diploides que muestran resistencia de campo (Jaramillo y Rojas, 2003; Jacobs *et al.*, 2010).

Para la identificación de QTL se ha recurrido al uso de marcadores genéticos, especialmente marcadores moleculares basados en PCR, que revelan diferencias genéticas entre organismos, individuos o entre especies. Por lo general, los marcadores no se encuentran dentro del gen de interés, pero si pueden estar cerca y actuar como señales, cuando se encuentran fuertemente ligados a genes o QTL que controlan la resistencia (Collard *et al.*, 2005). Usualmente se localizan en regiones no codificantes del genoma y no se ven afectados por factores ambientales o del desarrollo de la planta.

La identificación de genes de interés agronómico ha sido posible gracias al uso de marcadores moleculares que se encuentran ligados a ellos y que permiten seleccionar genotipos que expresen rasgos de interés. En los programas de mejoramiento se conoce como Selección Asistida por Marcadores, MAS, (*Marker Assisted Selection*). Esta metodología involucra el uso de la presencia/ausencia de marcadores para asistir la selección fenotípica, haciéndola más eficiente comparada con la mayoría de metodologías de mejoramiento convencional (Collard *et al.*, 2005).

En papa ya se ha empleado la selección asistida por marcadores. Son ejemplos: el empleo de marcadores para seleccionar material resistente al virus X de papa (PVX) (De-Jong *et al.*, 1997; Ritter *et al.*, 1991) y al virus M (Marczewski *et al.*, 2006) y a los nemátodos *Globodera rostochiensis* y *Globodera pallida* (Meksem *et al.*, 1995). Actualmente, se emplea también en mejoramiento el marcador StAOS2 que mapea en el cromosoma XI y hay cuatro alelos identificados que confieren cada uno de ellos resistencia y susceptibilidad a *Erwinia carotovora* y *Phytophthora infestans* (Pajerowska *et al.*, 2008; Pajerowska *et al.*, 2009). También se reportó el empleo del marcador GP94 que se asocia con resistencia duradera a gota, y que deriva su resistencia de *Solanum phureja* (Sliwka *et al.*, 2010).

En la identificación de marcadores genéticos basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se han desarrollado marcadores dependientes de la secuencia denominados SCAR (*Sequence Characterized Amplified Region*), los cuales suelen ser codominantes, monolocus y requieren el uso de *primers* específicos para amplificar la región de interés, son robustos, de bajo costo y de fácil manipulación (Collard *et al.*, 2005). Estos marcadores se desarrollan a partir de la secuenciación y clonación de RAPDs (*Random Amplified Polymorphic DNA*) (Arnedo-Andrés *et al.*, 2002; Ballvora *et al.*, 2002; Bautista *et al.*, 2003; Gedhardt *et al.*, 2004; Koveza *et al.*, 2001; Parasnis *et al.*, 2000) o de AFLPs (*Amplified Fragment Length Polymorphisms*) (Vos *et al.*, 1995; Negi *et al.*, 2000; Xu and Korban, 2002).

De acuerdo con el estudio realizado por Gebhardt *et al.* (2004), mediante la evaluación de marcadores genéticos basados en PCR sobre cultivares mejorados de papa del Banco Genético Gatersleben of Leibniz Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research de Alemania, los marcadores SCAR: CosA y BA47f2 se encuentran fuertemente asociados al gen *R1*, ratificando las distancias genéticas calculadas por Ballvora *et al.* (2002) de 0,2 cM y 0,1 cM, respectivamente.

Adicionalmente, el marcador Prp1 (*Pathogenesis-related glutathione S-transferase*) ocupa una posición distal en el grupo de ligamiento IX de papa (Taylor *et al.*, 1990) y se encuentra flanqueando un QTL que controla la resistencia cuantitativa a gota (Gebhardt and Valkonen, 2001; Mosquera, 2007).

El objetivo del presente estudio fue la evaluación del polimorfismo en marcadores SCAR asociados con resistencia a gota, sobre diferentes genotipos tetraploides y genotipos silvestres de papa *Solanum demissum*, *S. stoloniferum*, *S. andreanum*, *S. avilesii* y *S. tarijense*, con miras a determinar la presencia de regiones genómicas asociadas con la resistencia en estos genotipos.

Materiales y métodos

Este estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal Antonio Angarita, de la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá.

Material Vegetal

El material vegetal estudiado correspondió a los cultivares colombianos: Pastusa Suprema, Monserrate, Esmeralda, Betina, Parda Pastusa y Tuquerreña; a las introducciones del Centro Internacional de la Papa

(CIP): 392745-7, 392820-1, 393084-31, 393536-13, 394034-65, 394611-112, 394614-117, 396286-6, 396286-7, 397030-31, 397035-26, 397060-19, 397073-7, 397077-16, 720071, Yungueña y a las especies silvestres: *Solanum demissum*, *S. stoloniferum*, *S. andreanum*, *S. avilesii* y *S. tarijense*. La evaluación fenotípica relacionada con resistencia a *Phytophthora infestans* de este material, fue suministrada por el CIP (anexo 1).

Extracción de DNA

El DNA genómico fue extraído a partir de 500 mg de tejido foliar fresco en buffer de extracción que contiene Tris-HCL pH 8,0; 5M NaCl; 0,5M EDTA; 1% CTAB y 5% de β -mercaptoetanol, siguiendo el procedimiento descrito por Doyle and Doyle (1987). La calidad y cantidad del DNA fue evaluada mediante dos metodologías. La primera fue de tipo cualitativo, se realizó en geles de agarosa al 1% usando tinción con bromuro de etidio y por comparación con un DNA estándar. En la segunda se empleó el NanoDrop® ND-100. La concentración final de DNA se ajustó a 20 ng/ μ l.

Análisis de marcadores tipo SCAR

Cinco marcadores SCAR con posición conocida en el genoma fueron analizados para determinar su polimorfismo (tabla 1). Estos marcadores fueron reportados por Gebhardt *et al.*, (2004) y Taylor *et al.* (1990) como asociados y ligados a resistencia a *P. infestans*.

La reacción de PCR para los marcadores GP179, R1, BA47f2 y CosA fue realizada en un volumen final de 15 μ l que contenía 20 ng de DNA genómico, buffer de reacción estándar 10x (Invitro Life Technologies, Karlsruhe, Germany), 0,2 mM de dNTP, 0,7 μ M de cada oligonucleótido, 2,5 mM de $MgCl_2$ y 1 Unidad de Taq polimerasa (Invitrogen). El programa de PCR para estos marcadores fue el siguiente: temperatura de denaturación 93 °C por 90 segundos, seguido por 40 ciclos de 93 °C por 45 segundos, 45 segundos a la respectiva temperatura de *annealing* (tabla 1), 90 segundos a 72 °C y por último un ciclo de extensión de diez minutos a 72 °C.

Para el marcador Prp1 se modificaron las condiciones de PCR y el volumen final fue de 15,5 μ l, el cual contenía 20 ng de DNA genómico, buffer de reacción estándar 10x (Invitro Life Technologies, Karlsruhe, Germany), 0,26 mM de dNTP, 0,6 μ M de cada oligonucleótido, 3,9 mM de $MgCl_2$ y 1 Unidad de Taq polimerasa (Invitrogen). El programa de PCR correspondiente a este marcador fue: temperatura de denaturación 94 °C por 120 segundos, seguido por 40 ciclos de 93 °C por 45

Tabla 1: Secuencias específicas de los oligonucleótidos empleados y las características para su análisis

Marcador molecular	Secuencias de oligonucleicos	TA* (°C)	Tamaño fragmento pb	Cromosoma	Concentración gel %
CosA	f 5'CTCATTCAAATCAGTTTTGATC'3	55	210	V	4
	r 5'GAATGTTGAATCTTTTTGTGAAGG'3				
GP179	f 5'GGTTTTAGTGATTGTGCTGC'3	55	570	V	4
	r 5'AATTCAGACGAGTAGGCACT'3				
BA47f2	f 5'GGCCGCTCTAGAAGTGGATC'3	55	650	VIII	4
	r 5'AGTCTTAAAAATTCGACTCTAA'3				
R1	f 5'CACTCGTGACATATCCTCACCTA'3	55	1400	V	2
	r 5'CAACCCTGGCATGCCACG'3				
Prp1	f 5'GTGACATGAGCACATAAGTC'3	55	250	IX	2
	r 5'GCAACTTCACTTCTGCCATC'3				

* Temperatura de annealing

segundos, 45 segundos a la respectiva temperatura de annealing (tabla 1), 72 °C por 45 segundos y un ciclo de extensión de ocho minutos a 72 °C.

En todos los casos, se utilizó un control negativo, donde el DNA fue reemplazado por agua. Para el marcador R1 el control positivo utilizado fue el BAC, *BA87d17*, que contiene el gen (Ballvora *et al.*, 2002). Este BAC fue suministrado por Ballvora del Instituto Max Planck.

La electroforesis se realizó con buffer TAE 1x utilizando las condiciones de corrida específicas para cada marcador (tabla 1). Para estimar el tamaño de los fragmentos o alelos, se empleó marcador de peso de 100 pb de Fermentas y para la tinción se utilizó bromuro de etidio. Las imágenes fueron capturadas con el documentador de geles Molecular Imager® Gel doc™XR.

Análisis de la caracterización genética

La presencia de los fragmentos obtenidos para cada marcador fue evaluada a través del programa Quantity One-4.6.7® (Biorad, 2007), obteniéndose una matriz binaria de presencia (1) y ausencia (0) (Ghislain *et al.*, 2009; Mosquera, 2007). Los fragmentos que no se pudieron evaluar fueron declarados como perdidos (/). La similitud de la distribución de los fragmentos de los marcadores asociados con resistencia a *P. infestans*, en los materiales de estudio, se calculó por medio de un análisis de distancias entre variables binarias, usando el índice de similitud simple ó *Simple Matching*, utilizando el programa NTSYS-PC2.1.

Resultados

Análisis de los marcadores SCAR

Gen marcador R1: se obtuvieron cinco fragmentos de diferente peso molecular, identificados como R1₂₅₀, R1₅₀₀, R1₈₀₀, R1₁₀₀₀ y R1₁₈₀₀ junto con el principal producto, el fragmento 1400 pb, los cuales fueron polimórficos para los individuos estudiados.

Marcador CosA: se obtuvo la amplificación de dos fragmentos característicos, el primero de 250 pb, el cual fue monomórfico y el segundo de 210 pb, polimórfico entre los materiales estudiados.

Marcador BA47f2: para este marcador el fragmento asociado con resistencia a *P. infestans*, en cultivares de la subsp. *tuberosum*, corresponde a 650 pb (Gebhardt *et al.*, 2004). En este estudio, se pudo determinar un fragmento polimórfico de 500 pb, entre los materiales evaluados. El alelo BA47f2₅₀₀ se presentó en todos los niveles de resistencia y su ausencia fue característica en algunos de los individuos denominados como resistentes o altamente resistentes a gota (figura 1e).

Marcador GP179: se obtuvieron los fragmentos GP179₁₀₀, GP179₅₇₀ y GP179₁₀₀₀. Tanto GP179₁₀₀ como GP179₅₇₀ se presentaron en todos los individuos estudiados, mientras que el fragmento GP179₁₀₀₀ fue polimórfico. El fragmento asociado con la resistencia a gota para este marcador reportado por Gebhardt *et al.* (2004) es de 570 pb.

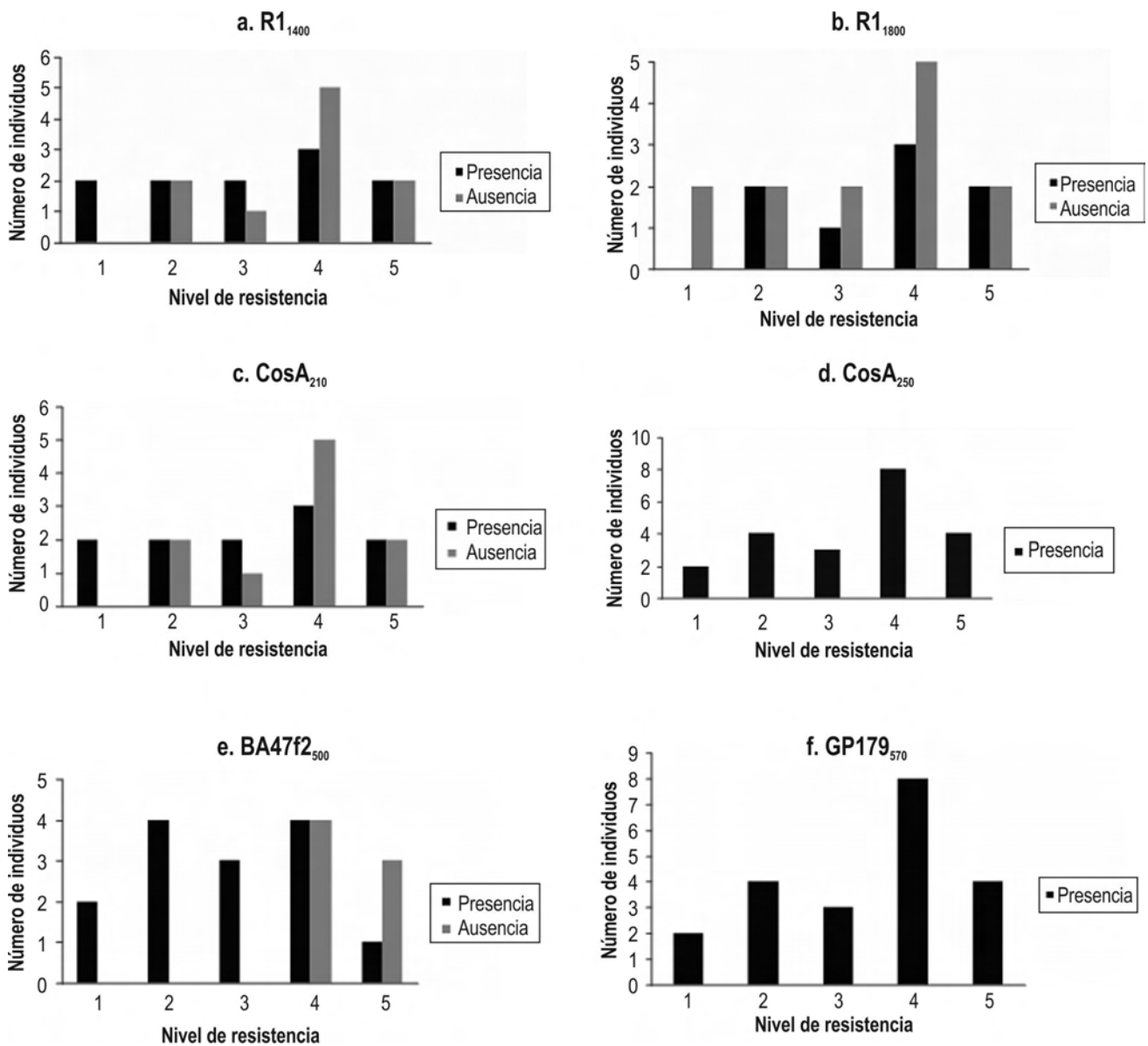


Figura 1. Comparación entre el nivel de resistencia en campo y la ausencia/presencia de los fragmentos asociados con resistencia a *P. infestans* evaluados para los fragmentos de cada marcador a. R1₁₄₀₀, b. R1₁₈₀₀, c. CosA₂₁₀, d. CosA₂₈₀, e. BA47f2₅₀₀ f. GP179₅₇₀. Niveles de resistencia: 1. Altamente susceptible, 2. Susceptible, 3. Moderadamente susceptible, 4. Resistente y 5. Altamente resistente

Marcador Prp1: presentó tres fragmentos característicos en todos los materiales evaluados, Prp1₃₀₀, Prp1₆₀₀ y Prp1₉₀₀.

Similitud entre los alelos marcadores

La presencia/ausencia de los alelos marcadores R1₁₄₀₀ y CosA₂₁₀ asociados con resistencia a *P. infestans* generaron una distribución similar entre el material de estudio, es decir, que la ocurrencia de estos fragmen-

tos fue 100% similar para ambos marcadores (tabla 2). Con respecto al fragmento GP179₅₇₀, su similaridad con los fragmentos R1₁₄₀₀ y CosA₂₁₀ fue del 59% (tabla 2) valor asociado con la distancia genética reportada entre los marcadores R1, CosA y GP179 equivalente a 0,8 cM (Ballvora *et al.*, 2002).

Para el alelo BA47f2₅₀₀ la similaridad fue del 48% con respecto a R1₁₄₀₀ y CosA₂₁₀. La relación entre BA47f2₅₀₀ y los demás marcadores dista de lo reportado por Ba-

Tabla 2. Similaridad entre la distribución de marcadores moleculares que han sido identificados en previos estudios como asociados con resistencia a *P. infestans* en los materiales evaluados. Los marcadores presentados en este análisis mapean en el cromosoma V en el QTL flanqueado por los marcadores GP179 y GP21 en el cual co-localiza el gen R1 que confirió resistencia raza específica.

	R1 ₁₄₀₀	CosA ₂₁₀	BA47f2 ₅₀₀	GP179 ₅₇₀
R1 ₁₄₀₀	1,00			
CosA ₂₁₀	1,00	1,00		
BA47f2 ₅₀₀	0,48	0,48	1,00	
GP179 ₅₇₀	0,59	0,59	0,66	1,00

llvora *et al.* (2002), quienes estimaron una distancia genética equivalente a 0,1 cM entre los marcadores mencionados.

Comparando el índice de similaridad calculado entre BA47f2₅₀₀ y GP179₅₇₀, se observó una semejanza del 66% (tabla 2).

Finalmente, el índice de similaridad para el marcador Prp1 con respecto a los demás no se calculó, ya que éste se encuentra en el cromosoma IX y sería un error inferir algún tipo de ligamiento.

Especies silvestres

Se evaluó la presencia de los marcadores GP179, CosA, BA47f2 y Prp1 en las especies silvestres de papa *Solanum demissum*, *S. stoloniferum*, *S. andeanum*, *S. avilesii* y *S. tarijense*. Se pudo determinar que en todas se presenta el fragmento CosA₂₅₀, mientras que el fragmento CosA₂₁₀ se presentó únicamente en la especie *S. demissum* (figura 3a).

Respecto al marcador R1 (figura 3b), el fragmento R1₁₄₀₀ únicamente se presentó en *S. demissum*, mientras que el fragmento R1₁₈₀₀ aparece en *S. demissum* y *S. tarijense* especies catalogadas como resistente y susceptible respectivamente. Adicionalmente, con este marcador se observaron bandas polimórficas correspondientes a los alelos R1₂₅₀, R1₃₅₀, R1₅₀₀, R1₈₀₀, R1₁₀₀₀.

La presencia de los fragmentos R1₁₄₀₀ y CosA₂₁₀ fue exclusiva para *S. demissum*. En el caso del marcador GP179 la banda asociada con resistencia de 570 pb se encontró en todas las especies silvestres evaluadas y además en el genotipo *S. tarijense* se presentó un alelo de 1000 pb (figura 3c).

El marcador BA47f2, presentó un fragmento difuso de 500 pb entre los genotipos silvestres evaluados. Por lo tanto, no fue posible determinar si este fragmento

fue poli o monomórfico. Lo que sí es distinguible con este marcador, es la diferencia en tamaño entre el fragmento asociado con resistencia de 650 pb y el que se reporta en este estudio de 500 pb.

Con el marcador Prp1 todos los genotipos silvestres aquí evaluados presentaron bandas polimórficas correspondiente a 300, 600 y 900 pb (figura 3e).

Discusión

Marcadores SCAR

La presencia de los fragmentos, R1₁₄₀₀ y CosA₂₁₀ está correlacionada con el incremento de resistencia a *P. infestans* tanto en tubérculo como a nivel foliar (Gebhardt *et al.*, 2004). Sin embargo, en el presente estudio, se observó que no existe una relación clara entre el nivel de resistencia a *P. infestans* y la presencia de los fragmentos R1₁₄₀₀ y CosA₂₁₀ (figura 1a y 1c), es decir, que estos fragmentos se presentaron tanto en individuos catalogados como resistentes como en no resistentes.

El alelo R1₁₈₀₀ fue asociado con la susceptibilidad a gota, tanto en follaje como en tubérculo en cultivares de *S. tuberosum* subsp. *tuberosum* (Gebhardt *et al.*, 2004), no obstante al analizar la relación entre la presencia de este fragmento y la resistencia, no fue posible identificar relación ni con resistencia ni con susceptibilidad, debido a que en todos los casos, aproximadamente el 50% de los individuos que presentaron este alelo son susceptibles y el 50% son resistentes (figura 1b). Los demás fragmentos obtenidos polimórficos en este estudio no se analizaron por su asociación con resistencia, ya que el estudio se concentró en el análisis de alelos reportados en estudios previos e identificados a través de análisis de asociación genética para evaluar estos resultados en materiales de *S. andigena*. Es importante evaluar el grado de asociación de estos alelos

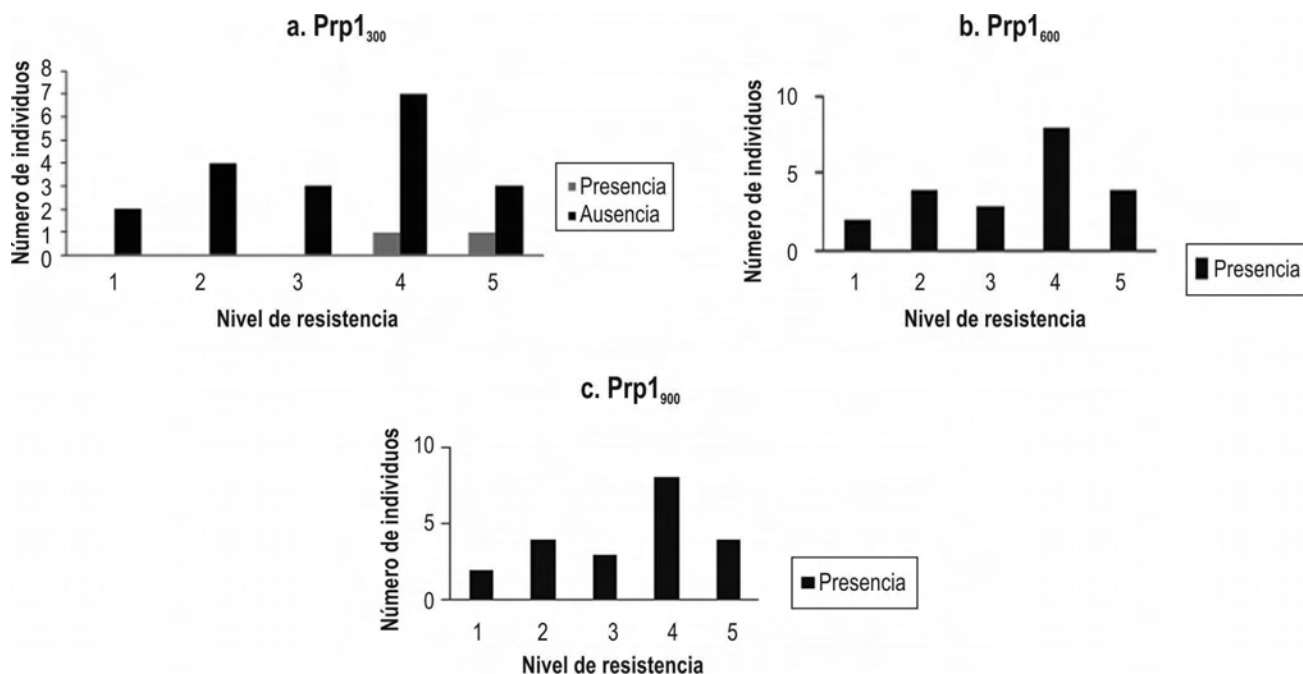


Figura 2. Comparación entre el nivel de resistencia en campo y la ausencia/presencia de los alelos asociados con resistencia a *P. infestans* evaluados para el marcador Prp1. a. 300 pb, b. 600 pb c. 900 pb. Niveles de resistencia: 1. Altamente susceptible, 2. Susceptible, 3. Moderadamente susceptible, 4. Resistente y 5. Altamente resistente.

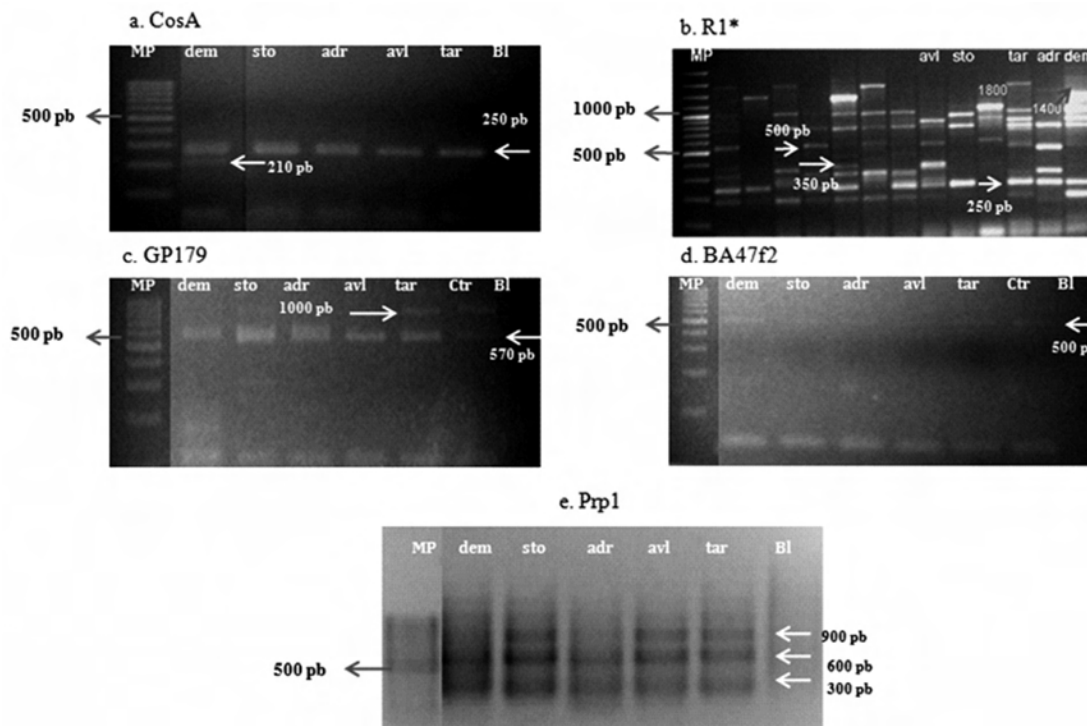


Figura 3. Presencia de los fragmentos asociados con resistencia a *P. infestans*, encontrados para los marcadores a. CosA, b. R1, c. GP179, d. BA47f2 e. Prp1 en las especies silvestres *Solanum demissum* (dem), *S. stoloniferum* (sto), *S. andeanum* (adr), *S. avilesii* (avl), *S. tarijense* (tar). En el caso del marcador R1 se utilizó el control (Ct) BA87d17, para los otros marcadores se utilizó como control (Ctr), DNA de tomate (*Solanum lycopersicum*) Mill en concentración de 50ng/μl. *Foto de R1 adaptada de Mosquera (2007)

polimórficos sea por su efecto positivo o negativo con resistencia a gota y diferenciado entre la resistencia en follaje y campo, tal como lo sugiere Danan *et al.*, (2009).

Para el marcador BA47f2 Gebhardt *et al.* (2004) reportan el fragmento de 650 pb como asociado a resistencia a *P. infestans*, en cultivares de la subsp. *tuberosum*. En este estudio se presentó el alelo BA47f2₅₀₀, en los diferentes niveles de resistencia, tanto en materiales susceptibles como resistentes. Sin embargo, su ausencia fue en su mayoría en algunos de los individuos que fueron catalogados como resistentes o altamente resistentes a gota (figura 1e). Esta diferencia en pares de bases, entre el fragmento reportado por Gebhardt *et al.* (2004) y el presentado en este estudio puede ser atribuida a la variabilidad alélica que se presenta en materiales genéticos sometidos a diferentes condiciones ambientales asociadas con el origen, la distribución geográfica y el ambiente donde se desarrollan estas especies (Raker and Spooner, 2002). La variabilidad alélica entre *S. tuberosum* subsp. *tuberosum* y *S. tuberosum* subsp. *andigena* ha sido reportada con anterioridad por Raker y Spooner (2002), quienes por medio del uso de microsatélites han podido determinar altos niveles de polimorfismo y heterocigosidad entre estas especies de papa.

El estudio realizado por Sukhotu *et al.* (2005), en el cual evaluaron la diversidad genética entre cultivares de las subespecies *andigena* y *tuberosum*, a través de la presencia o ausencia de fragmentos generados por marcadores tipo RFLPs (*Restriction Fragment Length Polymorphis*) de DNA nuclear y diferencias polimórficas entre microsatélites de DNA citoplasmático, se determinó la presencia de fragmentos con diferente peso molecular para el mismo marcador. Estas diferencias permitieron separar los cultivares *tuberosum* de los andinos.

Al comparar la resistencia en campo para clones de *S. tuberosum*, *S. andigena* y *S. phureja* se observaron diferencias en cuanto a penetración, velocidad de esporulación y tamaño de la lesión en los diferentes cultivares (Guzmán, 1964) citado por Estrada (2000), indicando claras diferencias entre el tipo de resistencia y el ataque del patógeno a nivel inter e intraespecífico.

El fragmento asociado con la resistencia a gota para el marcador GP179 reportado por Gebhardt *et al.* (2004) es de 570 pb; sin embargo, la presencia de este fragmento en los cultivares andinos evaluados, no pudo relacionarse de manera directa con la resistencia a *P. infestans*, debido a que se observó tanto en individuos resistentes como susceptibles, a diferencia de lo que ocurre en los cultivares europeos, aunque, para este

estudio, la presencia de este fragmento fue más frecuente entre los individuos reportados como resistentes (figura 1f). Estos resultados poco concluyentes para GP179₅₇₀ y opuestos en cuanto a su asociación con resistencia al patógeno, han sido reportados por Gebhardt *et al.* (2004), Oberthageman *et al.* (1999) y Díaz *et al.* (2003). Para aclarar esta discrepancia es necesario adelantar un estudio fenotípico detallado de respuesta ante la presencia del patógeno en los genotipos de interés o hacer uso de nuevas metodologías que se están empleando para identificar genes que confieran resistencia a *P. infestans* evaluando diferentes materiales genéticos (Mirjam *et al.*, 2010). De la misma forma, la ocurrencia en común del fragmento GP179₅₇₀ puede estar relacionada más específicamente con el hecho de que *S. tuberosum* subsp. *tuberosum* proviene de *S. tuberosum* subsp. *andigena*, observándose un fuerte solapamiento de caracteres, mas no necesariamente con la condición de resistencia a gota, la cual varía entre ambas especies (Huamán and Spooner, 2002).

El marcador Prp1 presentó tres fragmentos característicos en todos los materiales evaluados, Prp1₃₀₀, Prp1₆₀₀ y Prp1₉₀₀ (figura 2). Estos resultados difieren de los encontrados por Taylor *et al.* (1990). Según estos autores el marcador Prp1 flanquea un QTL para resistencia cuantitativa a gota, lo que explica la relación observada entre la presencia del marcador y la resistencia. Otros autores también han encontrado resultados contradictorios para este marcador (Gebhardt *et al.*, 2004; Oberthagemann *et al.*, 1999; Raker and Spooner, 2002).

Similaridad entre los alelos marcadores

La similaridad encontrada en los resultados de los marcadores R1₁₄₀₀ y CosA₂₁₀, coincide con el nivel de resistencia que presentaron los diferentes individuos evaluados (figura 1a y 1c). Esta similaridad entre los marcadores R1 y CosA sugiere que se encuentran fuertemente ligados, resultado esperado, teniendo en cuenta que la distancia genética entre ellos para *S. tuberosum* es de 0,2 cM (Ballvora *et al.*, 2002).

La similaridad entre el fragmento GP179₅₇₀ y los fragmentos R1₁₄₀₀ y CosA₂₁₀ en este estudio fue calculada en un 59% (tabla 2), valor asociado con la distancia genética calculada por Ballvora *et al.* (2002) de 0,8 cM entre los marcadores R1, CosA y GP179. Igualmente, se ha encontrado que aunque GP179 está flanqueando el QTL que contiene el gen *R1* (Gebhardt *et al.*, 1991; Meksem *et al.*, 1995), en el caso de cultivares tetraploides colombianos los alelos del marcador GP179₅₇₀ ligados a *R1*, fueron inespecíficos para identificar la presencia de este gen en dichos cultivares.

Similar resultado fue reportado por Díaz *et al.* (2003) quienes no pudieron asociar el marcador R2 con resistencia, ya que dicho marcador fue encontrado en genotipos resistentes y susceptibles.

La similaridad calculada entre el alelo BA47f2₅₀₀ y los alelos R1₁₄₀₀ y CosA₂₁₀ fue del 48% (tabla 2). Este valor dista de lo reportado por Ballvora *et al.* (2002) en donde estos calculan una distancia genética entre los marcadores mencionados, equivalente a 0,1 cM. Esta diferencia puede ser atribuida a que el alelo aquí reportado corresponde a un alelo de 500 pb para los cultivares de *S. tuberosum* subsp. *andigena* y no de 650 pb como lo reportaron Gebhardt *et al.* (2004) para los cultivares de *S. tuberosum* subsp. *tuberosum*. Esto permite concluir, que no se pueden aplicar de manera directa los resultados obtenidos en *S. tuberosum* subsp. *tuberosum* a los demás materiales de papa. Esto implica que se deben hacer mayores esfuerzos para encontrar marcadores moleculares diagnósticos que apoyen los trabajos de mejoramiento genético en Colombia.

Para el índice de similaridad calculado entre BA47f2₅₀₀ y GP179₅₇₀, se observó una semejanza del 66% (tabla 2), acorde con la distancia genética aproximada de 0,9 cM y la ubicación de estos dos marcadores dentro del cromosoma V.

Especies silvestres

En el análisis de las especies silvestres se determinó que en todos los materiales estudiados el fragmento CosA₂₅₀, estuvo presente, mientras que el fragmento CosA₂₁₀ se presentó únicamente en la especie *S. demissum* (figura 3a), este resultado está en consonancia con lo reportado por Gebhardt *et al.* (2004), en donde, el fragmento CosA₂₁₀ está presente en cuatro accesiones de *S. demissum* y en *S. dulcamara*, especies silvestres, que presentan resistencia a *P. infestans*.

La presencia de los fragmentos R1₁₄₀₀ y CosA₂₁₀ fue exclusiva para *S. demissum*, indicando co-segregación de estos alelos, debido a su alto grado de ligamiento. Aunque la resistencia generada por el gen *R1* derivada de *S. demissum* fue quebrada por el patógeno, se ha encontrado en materiales que presentan el gen *R1*, que genera un grado de resistencia de tipo cuantitativo (comunicación personal, Ballvora, 2009). El fragmento R1₁₈₀₀ aparece en *S. demissum* y *S. tarijense* especies catalogadas como resistente y susceptible respectivamente (figura 3b).

El alelo GP179₅₇₀ se encontró en todas las especies silvestres evaluadas (figura 3c). El marcador BA47f2, presentó un fragmento difuso de 500 pb sin llegarse a

definir como fragmento polimórfico o monomórfico, debido a la pobre resolución que presentó este marcador. Es importante resaltar que aunque este marcador mapea a 0,1 cM del gen *R1* (Gebhardt *et al.*, 2004), y podría constituirse al igual que el marcador CosA₂₁₀ en importante herramienta para selección, su baja resolución, la cual se evidencia también en este estudio, no permite hacer extensivo su uso.

Con el marcador Prp1 todos los genotipos silvestres aquí evaluados presentaron bandas polimórficas correspondiente a 300, 600 y 900 pb (figura 3e). Por lo tanto, es necesario tener en cuenta, para estudios posteriores, las interacciones epigenéticas y de genotipo por ambiente que puedan estar asociadas con cambios en el nivel de resistencia y la presencia de estas bandas.

De acuerdo a los resultados de esta investigación tanto en los cultivares tetraploides y silvestres estudiados, se identificaron polimorfismos con todos los marcadores evaluados, específicamente en los fragmentos que han sido reportados por su asociación con resistencia a *P. infestans*, exceptuando al marcador GP179 en el fragmento de 570 pb que fue monomórfico. Adicionalmente, no se encontraron los mismos resultados reportados para *S. tuberosum* subsp. *tuberosum* en la totalidad de los marcadores evaluados, indicando que no es posible aplicar directamente la presencia de marcadores moleculares asociados con resistencia a gota, entre las subsp. *tuberosum* y subsp. *andigena*.

Con base en este estudio se recomienda realizar caracterizaciones fenotípicas de la resistencia a *P. infestans* más precisas que permitan estimar la resistencia a nivel de tallo y follaje, ya que en campo se observan manifestaciones de resistencia y susceptibilidad que no han podido ser bien evaluadas con la escala que se ha aplicado y posiblemente esto dificulta la convergencia de los datos moleculares con las evaluaciones fenotípicas.

Agradecimientos

Los autores agradecen al Instituto Max Planck para Mejoramiento Genético por su apoyo y especialmente al Dr. Agim Ballvora por la donación del control positivo para el gen *R1* y al CIP por los datos de caracterización fenotípica.

Referencias bibliográficas

AGROCADENAS, 2005. La cadena de la papa en Colombia una mirada global de su estructura y dinámica 1991-2005. En: www.agrocadenas.gov.co consulta: abril de 2009.

- Arnedo-Andrés, M. S., Gil-Ortega, R., Arteaga, M. and Hormaza, J. L. 2002. Development of RAPD and SCAR markers linked to the *Pvr4* locus for resistance to PVY in pepper (*Capsicum annuum* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 105: 1067-1071.
- Ballvora, A., Ercolano, M. R., Weiss, J., Meksem, K., Bormann, C. A., Oberhagemann, P., Salamini, F. and Gebhardt, C. 2002. The *R1* Gene for potato resistance to late blight (*Phytophthora infestans*) belongs to the leucine Zipper/NBS/LRR class of plant resistance genes. *Plant Journal* 30: 361-371.
- Bautista, R., Crespillo, R., Canovas, F. M. and Claros, M. G. 2003. Identification of olive-tree cultivars with SCAR markers. *Euphytica* 129: 33-1.
- Biorad. 2007. Quantity One Software, 21f Ed.
- Bormann, C. A., Rickert, A. M., Castillo, R. A., Paal, J., Lübeck, J., Strahwald, J., Buhr, K., and Gebhardt, C. 2004. Tagging quantitative trait loci for maturity-corrected late blight resistance in tetraploid potato with PCR-based candidate gene markers. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 17 (10): 1126-1138.
- CEVIPAPA. 2008. Año internacional de la papa Diario económico Portafolio. Centro virtual de investigación de la cadena agroalimentaria de la papa, Bogotá.
- Collard, B. C. Y., Jahufer, M. Z. Z., Brouwer, J. B. and Pang, E. C. K. 2005. An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: The basic concepts. *Euphytica* 142: 169-196.
- Collins, A., Milbourne, D., Ramsay, L., Meyer, R., Chatot-Balandras, C., Oberhagemann, P., de Jong, W., Gebhardt, C., Bonnel, E., and Waugh, R. 1999. QTL for field resistance to late blight in potato are strongly correlated with maturity and vigour. *Molecular Breeding* 5: 387-398.
- Danan, S., Chauvin, J-E., Caromel, B., Moal, J-D., Pellé, R. and Lefebvre, V. 2009. Major-effect QTLs for stem and foliage resistance to late blight in the wild potato relatives *Solanum sparsipilum* and *S. spegazzinii* are mapped to chromosome X. *Theoretical and Applied Genetics* 119: 705-719.
- De Jong, W., Forsyth, A., Leister, D., Gebhardt, C. and Baulcombe, D. C. 1997. A potato hypersensitive resistance gene against potato virus X maps to a resistance gene cluster on chromosome V. *Theoretical and Applied Genetics* 95: 153-162.
- Díaz, M., Fajardo, D., Moreno, J., García, C. y Núñez, V. 2003. Identificación de genes *R1* y *R2* que confieren resistencia a *Phytophthora infestans* en genotipos colombianos de papa. *Revista Colombiana de Biotecnología* 5: 40-50.
- Doyle, J. J. and Doyle, J. L. 1987. A rapid DNA isolation procedure from small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 19: 11-15.
- Estrada, R. N. 2004. *La biodiversidad en el mejoramiento genético de la papa*. (Ed: Bill Hardy, CIP; Emma Martínez, CIP). PROINPA, CID, CIP. ISBN: 84-89891-68-0. Bolivia. 372 p.
- Fermentas. GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder Plus. In: F. L. Sciences (Ed.).
- Gebhardt, C., Ritter, E., Barone, A., Debener, T., Walkemeier, B., Schachtschabel, U., Kaufmann, H., Thompson, R. D., Bonierbale, M. W., Ganal, M. W., Tanksley, S. D. and Salamini, F. 1991. RFLP maps of potato and their alignment with the homeologous tomato genome. *Theoretical and Applied Genetics* 83: 49-57.
- Gebhardt, C. and Valkonen, J. P. T. 2001. Organization of genes controlling disease resistance in the potato genome. *Annual Review of Phytopathology* 39: 79-102.
- Gebhardt, C., Ballvora, A., Walkemeier, B., Oberhagemann, P., and Schüler, K. 2004. Assessing genetic potential in germplasm collections of crop plants by marker-trait association: a case study for potatoes with quantitative variation of resistance to late blight and maturity type. *Molecular Breeding* 13: 93-102.
- Ghislain, M., Nuñez, J., Herrera, M. R., Pignataro, J., Guzman, F., Bonierbale, M. and Spooner, D. M. 2009. Robust and highly informative microsatellite-based genetic identity kit for potato. *Molecular Breeding* 23: 377-388.
- Hawkes, J. G. 1990a. *The evolution of cultivated potatoes and their tuber-bearing wild relatives*. *Kulturpflanze* 36: 189-298.
- Hawkes, J. G. 1990b. *The potato-evolution, biodiversity and genetic resources*. London, UK.
- Huamán, Z. and Spooner, D. M. 2002. Reclassification of landrace populations of cultivated potatoes (*Solanum* sect. *Petota*). *American Journal of Botany* 89: 947-965.
- Jaramillo, S y Rojas, D. 2003. Aspectos Bioquímicos de la resistencia de la papa (*Solanum tuberosum*) al ataque del hongo *Phytophthora infestans*. *Revista Papa*. Grupo de Biotecnología- Universidad Nacional, Medellín.
- Jacobs, M. M. J., Vosman, B., Vleeshouwers, V. G. A. A., Visser, R. G. F., Henken, B. and van den Berg R. G. 2010. A novel approach to locate *Phytophthora infestans* resistance genes on the potato genetic map. *Theoretical and Applied Genetics* 120: 785-796.
- Koveza, O. V., Kokaeva, Z. G., Gostimsky, S. A., Petrova, T. V. and Osipova, E. S. 2001. Creation of a SCAR marker in pea *Pisum sativum* L. Using RAPD analysis. *Russian Journal of Genetics* 37: 464-470.
- Leonards-Schippers, C., Gieffers, W., Salamini, F. and Gebhardt, C. 1992. The *R1* gene conferring race-specific resistance to *Phytophthora infestans* in potato is located on chromosome V. *Molecular & General Genetics* 233: 278-283.
- Marczewki, W., Strzelezyk-Zyta, D., Hennig, J., Witek, K. and Gebhardt, C. 2006. Potato Chromosomes IX and XI carry genes for resistance to potato virus M. *Theoretical and Applied Genetics* 112: 1232-1238.
- Meksem, K., Leister, D., Peleman, J., Zabeau, M., Salamini, F. and Gebhardt, C. 1995. A high resolution map of the vicinity of the *R1* locus on chromosome V of potato based on RFLP and AFLP markers. *Molecular and General Genetics* 249: 74-81.
- Mirjam, M., Jacobs, J., Vosman, B., Vleeshouwers, V. G. A. A., Visser, R. G. F., Henken, B., and van den Berg, R. 2010. A novel approach to locate *Phytophthora infestans* resistance genes on potato genetic map. *Theoretical and Applied Genetics* 120: 785-796.
- Mosquera, T. 2007. *Análisis Genético y Molecular de la Resistencia Cuantitativa a Tizón Tardío (Phytophthora infestans) en Solanum*

- phureja*. Tesis de Doctorado. Facultad de Agronomía. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.
- Negi, M. S., Devic, M., Delseny, M. and Lakshmikumaran, M. 2000. Identification of AFLP fragments linked to seed coat colour in *Brassica juncea* and conversion to SCAR markers for rapid selection. *Theoretical and Applied Genetics* 101: 146-150.
- Oberhagemann, P., Chatot-Balandras, C., Schäfer-Pregl, R., Wegener, D., Palomino, C., Salamini, F., Bonnel, E., and Gebhardt, C. 1999. A genetic analysis of quantitative resistance to late blight in potato: towards marker-assisted selection. *Molecular Breeding* 5: 399-415.
- Parasnis, A. S., Gupta, V. S., Tamhankar, S. A., and Ranjekar, P. K. 2000. A highly reliable sex diagnostic PCR assay for mass screening of papaya seedling. *Molecular Breeding* 6: 337-341.
- Pajeroska, K., Shahid, M., Guex, N., Halim, V., Rosahl, S., Somssich, I., and Gebhardt, C. 2008. Natural variation of potato *allene oxidase synthase 2* causes differential levels of jasmonates and pathogen resistance in *Arabidopsis*. *Planta* 228: 293-306.
- Pajeroska, K., Stich, B., Achenbach, U., Ballvora, A., Lübeck, J., Strahwald, J., Tacke, E., Hofferbert, H., Ilarionova, E., Bellin, D., Walkemeier, B., Basekow, R., Kersten, B., and Gebhardt, C. 2009. Single nucleotide polymorphisms in the *Allene Oxidase Synthase 2* gene are associated with field resistance to late blight in populations of tetraploid potato cultivars. *Genetics* 181: 1115-1127.
- Raker, M. C. and Spooner, D. M. 2002. Chilean tetraploid cultivated potato, *Solanum tuberosum*, is distinct from the Andean populations: Microsatellite data. *Crop Science* 42: 1451-1458.
- Ritter, E., Debener, T., Barone, A., Salamini, F., and Gebhardt, C. 1991. RFLP mapping on potato chromosomes of two genes controlling extreme resistance to potato virus X (PVX). *Molecular and General Genetics* 227: 81-85.
- Sliwka, J., Jakuczun, H., Kaminski, P. and Zimnoch-Guzowska, E. 2010. Marker-assisted selection of diploid and tetraploid potatoes carrying *Rpi-phu1*, a major gene for resistance to *Phytophthora infestans*. *Journal of Applied Genetics* 51: 133-140.
- Sukhotu, T., Kamijima, O. and Hosaka, K. 2005. Genetic diversity of the Andean tetraploid cultivated potato (*Solanum tuberosum* L. subsp. *andigena* Hawkes) evaluated by chloroplast and nuclear DNA markers. *NRC Research Press*. 48: 55-64.
- Taylor, J. T., Fritzemeier, H., Häuser, I., Kombrink, E. and Rohwer, F. 1990. Structural analysis and activation by fungal infection of a gene encoding a pathogenesis-related protein in potato. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 3: 72-77.
- Visser, R. G. F., Bachem, C. W. B., de Boer, J. M., Bryan, G. J., Chakrabati, S. K., Feingold, S., Gromadka, R., van Ham, R. C. H. J., Huang, S., Jacobs, J. M. E., Kuznetsov, B., de Melo, P. E., Milbourne, D., Orjeda, G., Sagredo, B. and Tang, X. 2009. Sequencing the potato genome: Outline and first results to come from the elucidation of the sequence of the world's third most important food crop. *American Journal of Potato Research* DOI 10.1007/s12230-009-9097-8.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M. and Zabeau, M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acid Research* 23: 4407-4417.
- Xu, M and Korban, S. S. 2002. AFLP-derived SCARs facilitate construction of a 1.1 Mb sequence ready map of a region that spans the *Vf* locus in the apple genome. *Plant Molecular Biology* 50: 803-811.

Anexo 1. Información de los materiales vegetales empleados en el estudio

Código CIP	Nombre	Resistencia en campo
392745-7		Susceptible
392820-1		Altamente susceptible
393084-31	B3C1	Altamente resistente
393536-13		Altamente susceptible
394034-65		No disponible
394611-112		Resistente
394614-117		Moderadamente susceptible
396286-6		Resistente
396286-7		Resistente
397030-31		No disponible
397035-26		No disponible
397060-19		Moderadamente resistente
397073-7		Altamente susceptible
397077-16		Susceptible
720071	Diacol Monserrate	No disponible
Yungeña		No disponible
Pastusa suprema	Pastura suprema	Altamente resistente
Monserrate	Monserrate	Resistente
Esmeralda	Esmeralda	Resistente
Betina	Betina	Resistente
Parda pastusa	Parda pastusa	Moderadamente susceptible
Tuquerreña	Tuquerreña	Susceptible
175404-2	<i>Solanum demissum</i>	Altamente resistente*
161158-10	<i>Solanum stoloniferum</i>	Resistente*
247360-1	<i>Solanum andreanum</i>	No disponible
498091-4	<i>Solanum avilesi</i>	Resistente*
195206-12	<i>Solanum tarijense</i>	Susceptible*

* Datos tomados de Estrada (2004).