

Posible presencia de un gen *R1* en germoplasma de *Solanum tuberosum* Grupo Phureja

Possible presence of a gene *R1* in germplasm of *Solanum tuberosum* Phureja Group

Diana Carolina Ballesteros¹, Gustavo Gómez¹, María Cecilia Delgado¹, María Fernanda Álvarez¹,
Deissy Juyó¹, David Cuéllar¹ y Teresa Mosquera^{1,2}

RESUMEN

Phytophthora infestans causa la gota, que es la enfermedad en la papa de mayor importancia económica a nivel mundial. La obtención de cultivares resistentes al patógeno es una estrategia necesaria para su control, por lo cual la identificación de genes de resistencia a *P. infestans* (*Rpi*) es fundamental para apoyar los programas de mejoramiento. La introgresión de *Rpi* desde especies silvestres o nativas dentro de cultivares es una vía para desarrollar cultivares con resistencia. *S. phureja* tiene notables características culinarias y nutricionales, e igualmente ha sido identificada como una fuente de resistencia a la gota, lo cual la sitúa en una posición de interés desde el punto de vista de recurso genético con fines de mejoramiento. Se caracterizaron genotípicamente 88 accesiones de *S. phureja* con marcadores moleculares tipo SCAR, el gen *R1* de resistencia a *P. infestans*, el gen candidato *StAOS2* y un marcador tipo CAPS ligados a loci para resistencia a *P. infestans* en *Solanum tuberosum*. Se presentó polimorfismo en los marcadores Prp1 y *R1*. La amplificación del marcador *R1* mostró el alelo de 1.400 pb, característico del gen *R1* en 17 accesiones de la colección de *S. phureja*, lo cual sugiere que estas accesiones posiblemente podrían tener un gen homólogo al gen *R1* identificado en *S. demissum*.

Palabras clave: *Phytophthora infestans*, resistencia a gota, caracterización molecular, marcadores diagnóstico, *Solanum phureja*.

ABSTRACT

Phytophthora infestans causes late blight in potato. This disease is the most destructive worldwide. Developing cultivars resistant to the pathogen is the most important strategy for its control, so identification of resistance genes (*Rpi*) is fundamental to support breeding programs. Introgression of *Rpi* from wild or native species within cultivars can be a good way to develop resistant cultivars. *S. phureja* has important culinary and nutritional traits and has been identified as a source of resistance to late blight. 88 accessions of *S. phureja* were genotypically characterized with molecular SCAR markers, the resistance gene *R1* for *P. infestans*, the candidate gene *StAOS2* and a CAPS marker linked to loci for resistance to *P. infestans* in *Solanum tuberosum*. Polymorphism was presented in Prp1 and *R1* markers. The *R1* marker amplification showed the 1,400 pb allele, which represents the *R1* gene allele in 17 *S. phureja* accessions suggesting that these accessions could possibly have a homologous gene to the *R1* gene identified in *S. demissum*.

Key words: *Phytophthora infestans*, late blight resistance, molecular characterization, diagnostic markers, *Solanum phureja*.

Introducción

La papa, después del trigo y el arroz, constituye el tercer cultivo alimenticio más importante, con una producción mundial de 325 millones de toneladas para 2007 (FAO, 2010) y es el principal alimento no cereal en el mundo (Park *et al.*, 2009a). Este cultivo ocupó el cuarto lugar en la producción agropecuaria colombiana en el año 2003 con 1,9 millones de toneladas (Espinal *et al.*, 2005), y el tercer lugar en área sembrada, alrededor de 160.000 ha (Villarreal *et al.*, 2007).

La papa es afectada por el Oomycete *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary, que causa la enfermedad conocida en Colombia como gota. Es la enfermedad más destructiva del cultivo y puede ocasionar la pérdida total del mismo. La gota afecta tanto el follaje como el tubérculo (Fig. 1) (Bradshaw *et al.*, 2006). La gota causa reducción de 10-15% de la producción global anual. Las pérdidas y los costos estimados para el control de la enfermedad exceden anualmente los cinco billones de dólares (Park *et al.*, 2009b). En Colombia, los fungicidas para el control de gota representan el 6% de los costos de producción total (Villarreal *et al.*,

Fecha de recepción: 18 de febrero de 2010. Aceptado para publicación: 28 de julio de 2010

¹ Departamento de Agronomía, Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá (Colombia).

² Autor de correspondencia. tmosquerav@unal.edu.co

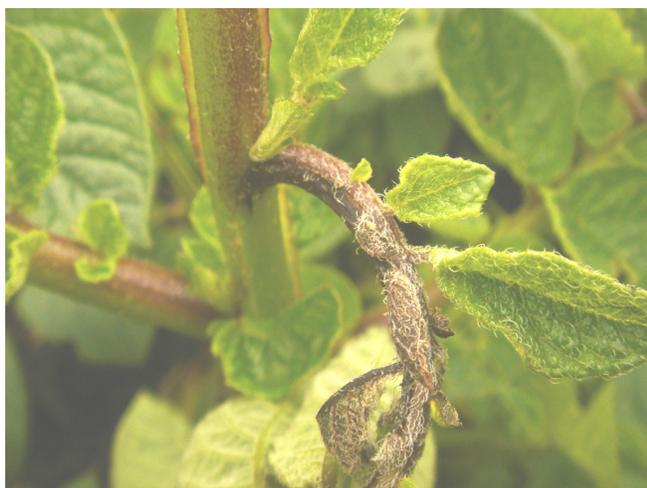


FIGURA 1. Planta de papa afectada por el Oomycete *Phytophthora infestans*. Se observa la lesión en follaje y estolones. Cortesía: L.E. Rodríguez.

2007). Los fungicidas son el medio más efectivo para el control de la enfermedad, pero producen daño ambiental (Ghislain *et al.*, 2001); por tanto, la obtención de cultivares resistentes a gota constituye un criterio fundamental en los programas de mejoramiento genético.

La papa criolla pertenece al Grupo Phureja, es diploide, aunque Ghislain *et al.* (2006) reportaron que algunos materiales de *S. phureja* exhibieron triploidia y tetraploidia. Colombia es el principal productor de papa criolla en Latinoamérica (Ligarreto y Suárez, 2003); también se cultiva en Ecuador, Bolivia y Centroamérica. Esta especie presenta periodo vegetativo corto, carece de periodo de reposo del tubérculo y tiene alto valor nutritivo (Escallón *et al.*, 2005). *S. phureja* ha sido identificada como una fuente efectiva de resistencia a gota (Estrada, 2004; Sliwka *et al.*, 2006; Mosquera, 2007; Núñez *et al.*, 2008; Sliwka *et al.*, 2010), y dado que presenta otros rasgos de interés agronómico, se le considera un importante recurso para fines de mejoramiento genético. La posibilidad de encontrar en *S. phureja* genes novedosos de resistencia a *P. infestans* ha sido ya reportada por Sliwka *et al.* (2006, 2010), quienes identificaron un gen mayor de resistencia, *Rpi-phu*, el cual confiere un amplio espectro de resistencia a gota. Este locus fue mapeado en el cromosoma IX. El efecto de este locus sobre resistencia se estimó evaluando la resistencia a nivel de foliolos, de discos de tubérculos y tubérculos completos, durante cinco años.

En papa se han descrito dos tipos de resistencia a gota (Umaerus y Umaerus, 1994). Una, la resistencia poligénica o general, se basa especialmente en un locus de efecto mayor para rasgos cuantitativos (QTL, *Quantitative Trait Locus*) y algunos QTL de efecto menor (Constanzo *et al.*,

2005; Simko *et al.*, 2006). La otra, es la resistencia de tipo específico, basada en el efecto de genes mayores de resistencia (*R*) de efecto dominante (Gebhardt y Valkonen, 2001; Bormann *et al.*, 2004).

Durante la primera mitad del siglo XX se descubrieron once genes *R* (*R1-R11*) derivados de la especie *S. demissum*. Algunos de ellos fueron introducidos en papas cultivadas (Niederhauser *et al.*, 1954; Stewart y Bradshaw, 2001). El primer mapeo de un gen para resistencia a *P. infestans* fue adelantado por Leonards-Schippers *et al.* (1994) y posteriormente este gen, el *R1*, fue clonado y caracterizado (Ballvora *et al.*, 2002). Este gen mapea en el cromosoma V. Otros genes derivados de *S. demissum* fueron mapeados en diferentes posiciones del genoma. El gen *R2* localizó en el cromosoma IV (Li *et al.*, 1998). Nueve genes *R*: *R3a*, *R3b* y *R5* a *R11* localizaron en el cromosoma XI (El-Kharbotly *et al.*, 1994; Huang *et al.*, 2004; Huang, 2005; Bradshaw *et al.*, 2006). Estudios de mapeo fino de *R3* revelaron que su resistencia la confieren dos genes fuertemente ligados, *R3a* y *R3b*, específicos para diferentes patógenos (Huang *et al.*, 2004; Huang, 2005). Recientemente Huang (2005) encontró que los genes *R5*, *R8*, *R9*, *R10* y *R11* son versiones alélicas del *R3*.

La resistencia de todos los genes *R* en papas cultivadas, provenientes de *S. demissum*, ha sido sobrepasada por *P. infestans*. Estos genes *R* (*R1*, *R2*, *R3* y *R4*) son ejemplos de resistencia no durable (Malcolmson y Black, 1966; Umaerus y Umaerus, 1994). Por esta razón, se plantea que la resistencia parcial conferida por QTL es más durable que la resistencia conferida por genes mayores *R* (Turkensteen, 1993).

El problema con resistencia parcial en *S. tuberosum* está referido a su fuerte correlación con madurez tardía (Wasstie, 1991). Por otra parte, la ubicación de los QTL, con frecuencia, corresponde a regiones con *clusters* de genes *R* (Grube *et al.*, 2000; Gebhardt y Valkonen, 2001). Tomando en consideración estos hechos, los esfuerzos recientes en la identificación de fuentes de resistencia se han concentrado en genes *R* que confieran resistencia de amplio espectro, es decir, genes derivados de diversas fuentes silvestres de *Solanum*. Por ejemplo, a partir de *S. berthaultii*, se introdujo el gen *R_{pi-ber}* mapeado en el cromosoma X (Ewing *et al.*, 2000; Rauscher *et al.*, 2006).

También se presentan genes de resistencia a *P. infestans* en otras especies, que no se pueden cruzar directamente con *S. tuberosum*, tales como el *Rpi1* de *S. pinnatisectum* en el cromosoma VII (Kuhl *et al.*, 2001), el gen *Rpi-mocl* de *S. mochiquense* en el cromosoma IX (Smilde *et al.*, 2005), de

S. bulbocastanum, los genes *RB* y *Rpi-blb1* mapearon en el cromosoma VIII (Naess *et al.*, 2000; Song *et al.*, 2003, van der Vossen *et al.*, 2003), *Rpi-blb2* mapeó en el cromosoma VI (van der Vossen *et al.*, 2005) y *Rpi-blb3* mapeó en el cromosoma IV y forma parte de un *cluster* con *R2* y *Rpi-abpt* y un gen parecido a *R2* de origen desconocido (Park *et al.*, 2005a; Park *et al.*, 2005b). Los genes *RB* y *Rpi-abpt* se están utilizando en programas de mejoramiento genético apoyados en hibridación somática y valiéndose de cruzamientos puente (Song *et al.*, 2003; Park *et al.*, 2005b).

Los diferentes materiales genéticos de papa poseen genes que contribuyen a generar resistencia a *P. infestans*, y genes que controlan otros rasgos de interés agronómico; por tanto, la estimación del potencial genético de diversos materiales –como silvestres, clones avanzados de mejoramiento, cultivares y materiales nativos– es una vía que puede permitir encontrar genes novedosos.

Para estimar el potencial genético, se requiere identificar marcadores moleculares diagnóstico. Gebhardt y Valkonen (2001) presentaron una exhaustiva revisión sobre la organización en el genoma de papa de los genes que controlan resistencia, y consolidaron información para construir un mapa en el que localizaron QTL y genes *R*, al igual que los marcadores asociados con ellos. Estudios posteriores han identificado nuevos marcadores moleculares (Gebhardt *et al.*, 2004; Pajeroska *et al.*, 2008; Pajeroska *et al.*, 2009).

Estos marcadores fueron identificados en materiales genéticos de *S. tuberosum*. Sin embargo, el fondo genético de *S. phureja* es diferente (Mosquera, 2007), por lo cual se deben realizar análisis para determinar su polimorfismo y su asociación o ligamiento con el carácter de resistencia.

Un número de loci que confieren resistencia cuantitativa (QRL) y alrededor de 40 genes mayores para resistencia han sido mapeados sobre el mapa molecular de papa (Simko *et al.*, 2007).

Esta investigación tuvo como objetivo evaluar en accesiones de la colección de *S. phureja* el polimorfismo de marcadores moleculares identificados en estudios previos en *S. tuberosum* por su ligamiento o asociación con el rasgo de resistencia a *P. infestans*.

Materiales y métodos

Material vegetal

En esta investigación se emplearon 88 accesiones de la colección de *S. phureja* con que cuenta la Universidad Nacional de Colombia (Tab. 1).

Extracción de DNA

La extracción de DNA se realizó a partir de 100 mg de tejido foliar fresco y joven. El tejido se maceró en nitrógeno líquido. Se siguió el protocolo suministrado por DNeasy

TABLA 1. Accesiones de la Colección de *S. phureja* de la Universidad Nacional de Colombia.

Accesiones de la colección de <i>S. phureja</i>				
COL2	COL27	COL56	COL96	COL125
COL4	COL30	COL57	COL98	COL126
COL5	COL31	COL59	COL99	COL127
COL6	COL32	COL62	COL100	COL128
COL7	COL33	COL63	COL101	COL129
COL8	COL34	COL65	COL102	COL131
COL9	COL35	COL66	COL104	COL135
COL11	COL37	COL69	COL106	COL136
COL13	COL38	COL72	COL109	COL137
COL14	COL40	COL73	COL112	COL138
COL16	COL41	COL74	COL113	COL141
COL17	COL42	COL76	COL114	COL142
COL19	COL43	COL79	COL117	COL143
COL20	COL45	COL83	COL119	COL144
COL21	COL51	COL87	COL122	COL145
COL23	COL52	COL89	COL123	COL186
COL24	COL53	COL94	COL124	COL47R

Plant Mini Kit (QIAGEN Inc., Valencia, CA). La calidad y pureza del DNA se evaluaron con el espectrofotómetro NanoDrop® ND-1000 V3.2 (NanoDrop Technologies, Inc., Wilmington, DE). Luego de cuantificar el DNA, su concentración se ajustó a 50 ng μL^{-1} .

Caracterización genotípica

Se analizaron marcadores moleculares tipo SCAR (Prp1, CosA, GP179, BA47f2), el gen marcador *R1*, el gen candidato *StAOS2* y un marcador tipo CAPS (GP21). Estos marcadores se seleccionaron porque han sido ligados a loci para resistencia a *P. infestans* en *Solanum tuberosum*. Los marcadores empleados, con excepción de Prp1 y *StAOS2*, mapean en el *hot spot* de resistencia a enfermedades localizado en el cromosoma V. Se evaluó la presencia/ausencia de fragmentos de tamaños específicos esperados para cada marcador (Tab. 2) en los genotipos evaluados.

La reacción de PCR para cada uno de los marcadores se realizó con 50 ng de DNA genómico.

Los marcadores *R1*, *CosA*, *GP179* y *BA47f2* fueron amplificados en las siguientes concentraciones: *buffer* (44,64 mM KCl, 8,92 mM Tris-HCl, 15 mM MgCl_2 y pH de 8,3) 0,17 mM dNTPs, 0,59 mM de cada *primer*, 0,004% BSA, 2,3 mM MgCl_2 y una unidad de Taq Polimerasa (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA). Las condiciones para la amplificación fueron: desnaturalización inicial por 2 min a 93°C, 40 ciclos de 45 s a 93°C, 45 s a 55°C, que correspondió a la temperatura de anillamiento, 90 s a 72°C, y un ciclo de extensión final por 10 min a 72°C.

La reacción de amplificación para el marcador Prp1 se realizó usando: *buffer* (64,5 mM KCl, 12,9 mM Tris-HCl, 15 mM MgCl_2 y pH de 8,3); 0,26 mM dNTPs, 0,4 mM de cada *primer*, 0,004% BSA, 1,93 mM MgCl_2 y una unidad de Taq Polimerasa (Invitrogen Corporation).

Las condiciones para la PCR fueron: desnaturalización inicial por 2 min a 94°C, 40 ciclos de 45 s a 92°C, 45 s a 55°C, correspondiente a la temperatura de anillamiento, 45 s a 72°C, y un ciclo de extensión final por 8 min a 72°C.

Las mismas concentraciones de *buffer*, dNTP y BSA empleadas para la amplificación del marcador Prp1 se usaron para la reacción del marcador *StAOS2*. Para este marcador se emplearon 0,23 mM de cada *primer*, 1,43 mM de MgCl_2 y una unidad de Taq Polimerasa (Invitrogen Corporation).

El programa de amplificación seguido fue: desnaturalización inicial por 3 min a 95°C, 35 ciclos de 45 s a 92°C, 40 s a 59°C, 90 s a 72°C, y un ciclo para la extensión final de 10 min a 72°C.

La reacción para el marcador GP21 se realizó usando las mismas condiciones del marcador *StAOS2*, con excepción de la concentración de cada uno de los *primers*, la cual fue de 0,6 mM.

Las condiciones para la PCR fueron: desnaturalización inicial por 2 min a 93°C, 39 ciclos de 45 s a 93°C, 45 s a 55°C, 80 s a 72°C, y un ciclo de extensión final de 8 min a 72°C.

Para el CAPS, la secuencia amplificada se digirió de forma separada con las enzimas *AluI* y *RsaI* (Bio-Labs®, Ipswich, MA). Las reacciones se llevaron a cabo usando 2 unidades de la enzima respectiva, 1X NE-Buffer 4 (20 mM Tris-acetato, 50 mM potasio-acetato, 10 mM magnesio-acetate, 1 mM dithiothreitol y pH 7,9). La reacción de digestión se llevó a cabo a 37°C, durante 2 h, y posteriormente se elevó la temperatura a 67°C para inactivar las enzimas.

Los productos de amplificación se analizaron en geles de agarosa al 2% y se visualizaron empleando bromuro de etidio. Las imágenes se capturaron con el documentador

TABLA 2. Marcadores moleculares basados en PCR empleados para la caracterización genotípica de accesiones de la colección de *S. phureja*.

Marcador	<i>Primer</i> sentido 5' a 3'	<i>Primer</i> antisentido 5' a 3'	T ^o A ¹	Tipo de marcador	Tamaño fragmento esperado en pb	Referencia
BA47f2	taaccaacattatctctttgccc	gaatttgagaggggtttgctg	55	SCAR	650	Gebhardt <i>et al.</i> , 2004
R1	cactcgtgacatatacctcacta	caacctgcatgccacg	55	Gen <i>R1</i>	1.400	Ballvora <i>et al.</i> , 2002
CosA	ctcattcaaatcagltttgatc	gaatggtgaatcttttggaaagg	55	SCAR	210	Gebhardt <i>et al.</i> , 2004
GP179	ggggggagtgattgtgctgc	aatttcagacgtagggcact	55	SCAR	570	Oberhagemann <i>et al.</i> , 1999
Prp1	gtgacatgagcacataagtc	gcaacttcacttctgccatc	55	SCAR	250 - 900	Hahn y Stitmatter, 1994
GP21/ <i>AluI</i>	cgttggtggcctattagcca	gctccaacacggaaggtttc	55	CAPS	250 - 450	Meksem <i>et al.</i> , 1995
GP21/ <i>RsaI</i>				CAPS	1.100	Meksem <i>et al.</i> , 1995
<i>StAOS2</i>	ttgatgttctctctcttct	gcggatttactccgatcgg	58,2	Gen candidato	679	Pajerowka <i>et al.</i> , 2008

¹ T^oA, temperatura de anillamiento

de geles Molecular Imager® Gel Doc™ XR+ (Bio-Rad Laboratories, Philadelphia, PA). Los alelos obtenidos se compararon con los esperados y se analizó para cada material su presencia/ausencia y se correlacionaron con datos de evaluación fenotípica.

Resultados

Marcador Prp1: mostró alelos de tamaños de 250 pb, 550 pb y 850 pb. El alelo marcador *Prp1*₂₅₀ no estuvo presente en 14 de las 88 accesiones evaluadas (Fig. 2). La accesión número Col 74 únicamente mostró el alelo de 250 pb.

Marcador CosA: generó un fragmento monomórfico de aproximadamente 280 pb (Fig. 3). En las accesiones evaluadas no se presentó el alelo característico de CosA de 210 pb ligado con el gen *R1*. Fragmento que ha sido asociado con resistencia a *P. infestans* y madurez tardía en *S. tuberosum* (Gebhardt *et al.*, 2004).

Marcador GP179: generó fragmentos monomórficos de 550 pb y 1200 pb para todas las accesiones evaluadas (Tab. 3).

Marcador GP21: es un marcador tipo CAPS (*Claved Amplified Polymorphic Sequence*). La restricción del producto de PCR se realizó con las enzimas *AluI* y *RsaI*. Se obtuvieron tres alelos de 1.400 pb, 900 pb y 500 pb con la enzima *AluI*, mientras que con la enzima *RsaI* se obtuvo un fragmento de 1.200 pb, y no se presentó polimorfismo (Tab. 3).

Marcador BA47f2: presentó fragmentos monomórficos de 180 pb, 400 pb y 500 pb. No se presentó el fragmento de tamaño esperado de 650 pb reportado para *S. tuberosum* (Tab. 3).

Gen marcador R1: la amplificación de este marcador generó algunos productos menores de diferentes tamaños junto con el principal producto, el fragmento de 1.400 pb, el cual se encontró en 17 de las accesiones evaluadas. Este fragmento correspondería a un fragmento característico del gen *R1* de resistencia, la banda encontrada concuerda con el control positivo BA87d17BACR1 (donado por A. Ballvora) (Fig. 4).

Gen que codifica para Allene Oxide Sintasa 2 (StAOS2): se encuentra localizado en el cromosoma XI. Es un gen candidato para resistencia cuantitativa a *P. infestans* y a la bacteria *Erwinia carotovora*. El alelo de tamaño 679 pb fue ligado al incremento de resistencia. En este estudio se obtuvo un fragmento de 600 pb (Fig. 5).

Los marcadores evaluados, Prp1 y R1, presentaron polimorfismo. En el caso del marcador R1, se presentó polimorfismo para diferentes alelos, los cuales fueron designados de acuerdo con el tamaño del fragmento obtenido, así: R1₁₇₅₀, R1₁₅₀₀, R1₁₄₀₀, R1₁₂₀₀, R1₆₀₀, R1₃₀₀, y R1₂₂₀ (Tab. 3).

Discusión

No se encontró polimorfismo para los marcadores CosA, GP179, GP21 y BA47f2, lo que puede ser debido al fondo genético diferente de *S. phureja* y a que estos marcadores fueron diseñados para cultivares modernos de *S. tuberosum* (Ghislain *et al.*, 2001).

El marcador Prp1 mapea en el cromosoma IX; es un importante marcador para identificar resistencia debido a que la infección de papa producida por *P. infestans* da como resultado la activación de genes que codifican proteínas

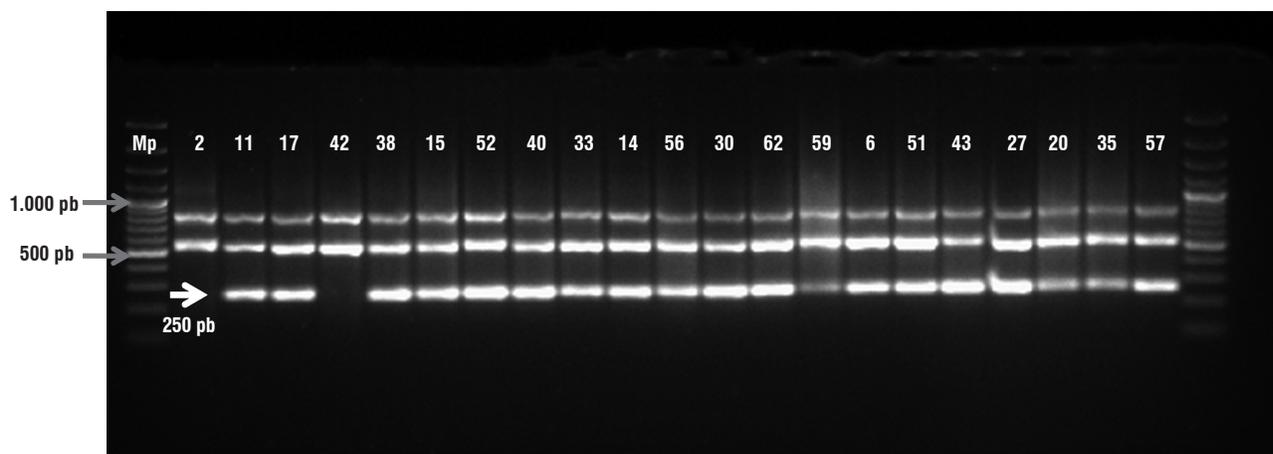


FIGURA 2. Marcador Prp1 en accesiones de *S. phureja*. Se observan tres alelos de Prp1: 850 pb; 550 pb y 250 pb. Se presenta polimorfismo para el alelo de 250 pb. En la parte superior de cada carril se indica el número de la accesión. Marcador de peso (Mp) de 100 pb.

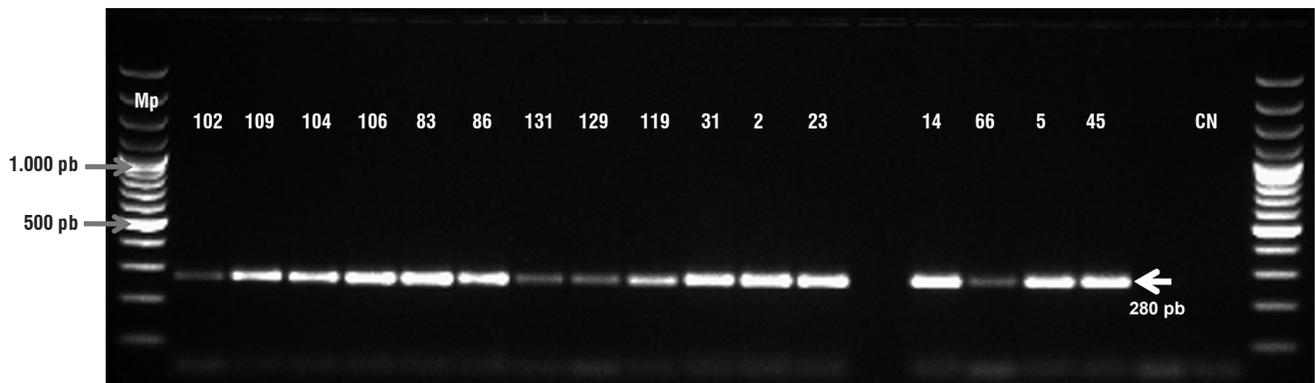


FIGURA 3. Marcador CosA evaluado en accesiones de *S. phureja*. Se observa una banda monomórfica de 280 pb. En la parte superior se muestra el número de la accesión. Marcador de peso (Mp) de 100 pb. CN, control negativo.

TABLA 3. Tamaño de los fragmentos obtenidos y alelos que presentaron polimorfismo en las accesiones de *S. phureja*.

Marcador	Fragmentos esperados en pb	Fragmentos obtenidos en pb	Alelos marcadores pb	Cromosoma
BA4712	650	180-400-500		V
R1	1400	220-300-600-1200 1400-1500-1750	220-300-600-1200 1400-1500-1750	V
CosA	210	280		V
GP179	500-570	550-1200		V
Prp1	250-900	250-580-900	250	IX
GP21 - <i>AluI</i>	250-450	1400 - 900 - 500		V
GP21 - <i>RsaI</i>	1.100	1.200		V
STAOS2	679	600		XI

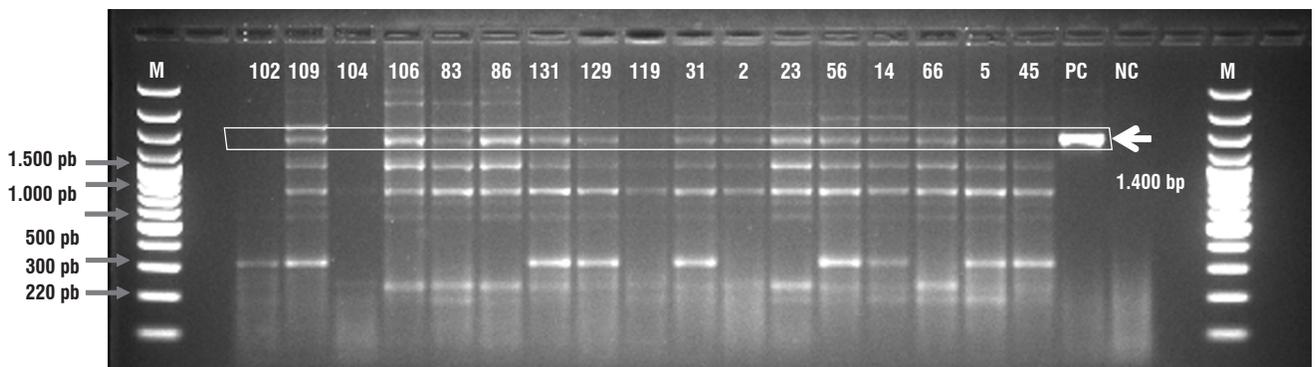


FIGURA 4. Marcador R1 evaluado en accesiones de *S. phureja*. Se observan las accesiones que presentaron el alelo polimórfico de 220 pb, 300 pb, 1.400 pb, 1.500 pb y 1.750 pb, siendo este alelo asociado con resistencia a *P. infestans*. El control positivo (PC) corresponde a BA87d17BACR1, el último carril corresponde al control negativo (NC).

para señales de respuesta, tales como la proteína codificada por el gen *Prp1-1*, el cual codifica para una auxina sensible a glutatión-S-transferasa. En el caso de este gen, la acumulación de mRNA derivada de la familia de los genes *Prp1* es selectivamente inducida por el ataque del patógeno y no en respuesta a estímulos abióticos, a diferencia de la mayoría de otros genes involucrados con señales de respuesta (Hahn y Strittmatter, 1994).

Los marcadores GP21 y GP179 se encuentran separados entre sí por una distancia de 3 cM (Gebhardt *et al.*, 2004).

Entre estos dos marcadores se encuentra el gen *R1*. El marcador GP179 generó dos fragmentos monomórficos de 550 pb y de 1.200 pb. Los fragmentos esperados para el marcador GP179 en *S. tuberosum* son de 500 pb y 570 pb, siendo polimórfico el de 570 pb correlacionado con el gen *R1* (Gebhardt *et al.*, 2004). En estudios previos realizados por Oberhagemann *et al.* (1999) y Mosquera (2007), quienes trabajaron con poblaciones experimentales contrastantes, los primeros autores entre especies silvestres, y el segundo con *S. phureja*, encontraron también tamaños de fragmentos diferentes a los reportados para *S. tuberosum*.

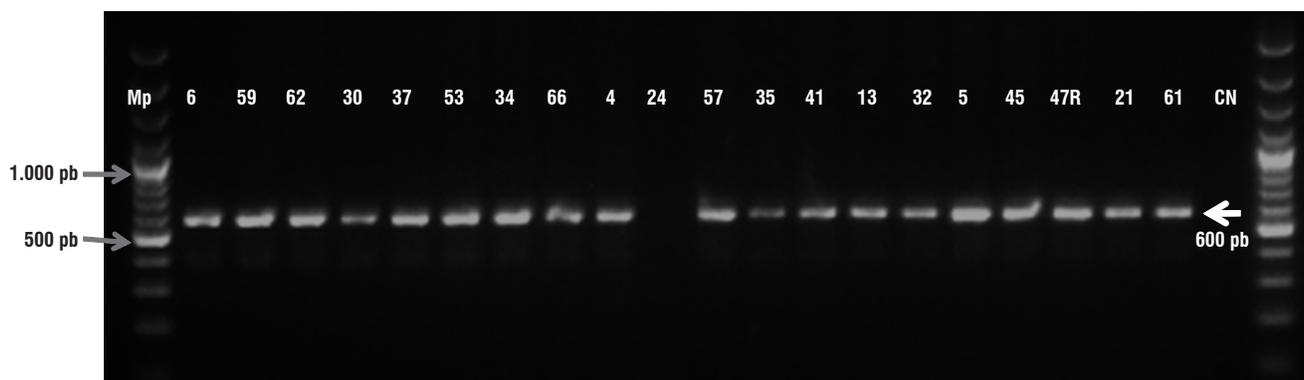


FIGURA 5. Gen candidato para resistencia cuantitativa a *P. infestans* *StAOS2* en accesiones de *S. phureja*. Se observa un fragmento de 600 pb. Marcador de peso (Mp) de 100 pb. Control negativo en el último carril (CN).

Estos resultados pueden significar que es muy diverso el germoplasma del Grupo Phureja, lo cual puede ser confirmado en el estudio realizado por Ghislain *et al.* (2006), en donde se emplearon marcadores nSSR (microsatélites nucleares) como indicadores de ploidía en especies diploides, empleando 128 accesiones de la especie *S. phureja* y revelando que 25 accesiones de las 128 eran triploides y tetraploides. Por otra parte, las diferencias en los fragmentos pueden ser debidas a que este marcador fue diseñado para *S. tuberosum* y no para *S. phureja*.

El marcador BA47f2 mapea en el intervalo genético GP21-GP179, en el cromosoma V (Rickert *et al.*, 2003). El marcador BA47f2 se encuentra a una distancia genética de 0,1 cM del locus *R1*, correspondiendo a una distancia física de aproximadamente 300 Kb (Ballvora *et al.*, 2002). El fragmento de 650 pb generado por el marcador BA47f2 en *S. demissum* fue asociado con incremento de resistencia a gota (Gebhardt *et al.*, 2004). Los materiales genéticos analizados en el presente estudio no amplificaron el fragmento asociado con resistencia a gota. Es de señalar que este marcador también se presenta débil en *S. tuberosum* y algunas veces no amplifica el fragmento esperado.

El gen marcador *R1* mapea en el cromosoma V; su amplificación mostró varios alelos polimórficos (Tab. 3). Es necesario evaluar su presencia/ausencia en contraste con evaluaciones fenotípicas de carácter cuantitativo para determinar si la presencia del alelo *RI*₁₄₀₀ se puede asociar con resistencia a gota, y también evaluar los otros alelos polimórficos para este marcador

Se destaca en los resultados la presencia del alelo marcador *RI*₁₄₀₀, que corresponde con el control positivo para presencia del alelo *R1*, gen mayor que fue clonado y caracterizado, y que co-localiza con el QTL mayor y más estable mapeado para resistencia a gota (Ballvora *et al.*, 2002; Bormann *et al.*, 2004; Ballvora *et al.*, 2007).

Un alelo ligado altamente con resistencia a gota y con madurez tardía en *S. tuberosum* es el alelo *CosA*₂₁₀, el cual mapea en el cromosoma V. Este alelo marcador está asociado con el gen de resistencia *R1*. *CosA* co-segrega con el gen *R1*, en materiales genéticos que derivan su resistencia de la especie silvestre *S. demissum*. También se ha encontrado el fragmento *CosA* en las especies *S. dulcamara* y *S. microdontum* (Gebhardt *et al.*, 2004). Este alelo es informativo para identificar posible resistencia generada por el gen *R1* (Bormann *et al.*, 2004). En esta investigación no se encontró co-segregación del alelo marcador *RI*₁₄₀₀ con el alelo *CosA*₂₁₀; este resultado puede indicar que el fragmento encontrado en las 17 accesiones de *S. phureja*, corresponde a una secuencia homóloga a *R1* o también puede ser debido al fondo genético diferente de *S. phureja* en comparación con la fuente original de *S. demissum*.

Díaz *et al.* (2003) caracterizaron genotípicamente plantas de *S. tuberosum*, con los marcadores *R1* y *R2*, y emplearon como control negativo plantas de *S. phureja* en las cuales no encontraron presencia del alelo marcador para *R1*.

Es necesario conocer sobre la funcionalidad de *RI*₁₄₀₀ en cuanto a resistencia de tipo específica, para lo cual se adelantan los correspondientes experimentos, así como el análisis de secuencia del alelo encontrado para estas accesiones de *S. phureja*.

El gen que codifica para *Allene Oxide Sintasa 2* (*StAOS2*) localiza en el cromosoma XI, y es el primer gen reportado que tiene control sobre resistencia cuantitativa a gota (Pajerowska *et al.*, 2008; Pajerowska *et al.*, 2009). Estos mismos autores, en estudios sobre variabilidad alélica, identificaron para el alelo de 679 pb SNP, que pudieron asociar con resistencia y susceptibilidad a los patógenos *P. infestans* y a la bacteria *Erwinia carotovora*. El presente estudio amplificó un alelo de 600 pb, el cual está siendo

estudiado para relacionar posibles variantes alélicas con el carácter de resistencia.

Ñústez *et al.* (2008) reportaron las accesiones de *S. phureja* con alta resistencia y susceptibilidad a gota. Las accesiones susceptibles en campo fueron las identificadas como Col102, Col87 y Col62. Estas accesiones presentaron el alelo *Prp1*₂₅₀. Sin embargo, las accesiones Col101, Col96, Col61, Col41 y Col2, que fueron también reportadas por Ñústez *et al.* (2008) como susceptibles en campo, en este estudio no presentaron el alelo 250 pb. Por tanto, este alelo no se puede asociar con estos datos al carácter de susceptibilidad. Algunas accesiones susceptibles, como las Col87 y Col2, presentaron el alelo *RI*₁₄₀₀, el cual se encuentra asociado con resistencia en *S. tuberosum*. Según este resultado no es claro que el alelo *RI*₁₄₀₀ esté confiriendo resistencia. Es necesario hacer el estudio funcional para dicho fragmento y contrastar los resultados con evaluaciones fenotípicas de carácter cuantitativo que permitan correlacionar con mayor precisión los datos moleculares con los fenotípicos.

De acuerdo con Ñústez *et al.* (2008), las accesiones Col131, Col30, Col5 y Col3 presentaron resistencia en campo; sin embargo, en ellas no se presentó el alelo de 250 pb para el marcador *Prp1*, aunque sí se presentó el alelo de 1.400 pb en las accesiones Col131 y Col5 para el marcador *RI*.

La presencia del fragmento de 1.400 pb en 17 accesiones del Grupo Phureja de la colección de *S. phureja* se constituye en una posible y nueva evidencia de la presencia de genes mayores de resistencia en *S. phureja*. Mosquera (2007) reportó un QTL mayor mapeado en el cromosoma IV, y aunque no hay evidencia en dicho estudio de que el efecto del QTL sea debido a un gen mayor que co-localiza en el intervalo reportado, no se puede descartar la presencia de un gen de esta naturaleza. También Sliwka *et al.* (2006) reportaron inicialmente la presencia de un nuevo locus mayor que mapea en el cromosoma IX, *Rpi-phu1*, el que confiere resistencia a gota y proviene de *S. phureja*. Posteriormente, Sliwka *et al.* (2010) reportaron el primer gen mayor de resistencia a *P. infestans* en germoplasma de *S. phureja* *Rpi-phu1*, el cual está asociado al alelo marcador *GP94*₂₅₀. Se destaca que el gen *Rpi-phu1*, se ha introducido en los programas de mejoramiento, y el alelo marcador se está empleando en selección asistida para resistencia a gota.

Se recomienda hacer la caracterización fenotípica para el gen *RI* para las accesiones que presentaron el alelo de 1.400 pb del gen *RI*, y profundizar en el análisis para determinar si se trata de un gen homólogo al gen *RI* derivado de *S. demisum*. También se aconseja realizar evaluaciones

fenotípicas de carácter cuantitativo para evaluar resistencia, que permitan hacer asociaciones precisas de los datos genotípicos con los datos fenotípicos.

Nuevos enfoques metodológicos se están usando para identificar genes que confieran resistencia a *P. infestans* evaluando diferentes materiales genéticos (Mirjam *et al.*, 2010). Pese a todas estas investigaciones, aún es necesario continuar en la búsqueda de genes que confieran amplio espectro de resistencia para poder emplearlos en programas de mejoramiento genético.

La presente investigación es la primera que evalúa accesiones de la colección colombiana de *S. phureja*, con marcadores que han sido reportados como ligados o asociados a QTL y genes mayores de resistencia a *P. infestans*, como aproximación a un estudio de asociación genética conducente a identificar marcadores moleculares diagnóstico para resistencia a gota.

Agradecimientos

Al doctor Agim Ballvora, del Max Planck Institute, Colonia, por la donación del BA87d17BACR1, control positivo para el gen *RI*. Esta investigación está enmarcada dentro del proyecto “Identificación de marcadores moleculares asociados a resistencia a *Phytophthora infestans* mediante estudio de asociación rasgo-marcador en *Solanum phureja* (2008S72170-6187)”. Los autores agradecen al Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, Bogotá por la financiación.

Literatura citada

- Ballvora, A., M.R. Ercolano, J. Weiss, K. Meksem, C.A. Bormann, P. Oberhagemann, F. Salamini y C. Gerbhardt. 2002. The *RI* gene for potato resistance to late blight (*Phytophthora infestans*) belongs to the leucine Zipper/NBS/LRR class of plant resistance genes. *Plant J.* 30(3), 361-371.
- Ballvora, A., A. Jocker, P. Viehover, H. Ishihara, J. Paal, K. Meksem, R. Bruggmann, H. Schoof, B. Weisshaar y C. Gerbhardt. 2007. Comparative sequence analysis of *Solanum* and *Arabidopsis* in a hot spot for pathogen resistance on potato chromosome V reveals a patchwork of conserved and rapidly evolving genome segments. *BMC Genomics* 8(112), 1-50.
- Bormann, C.A., A.M. Rickert, R.A. Castillo Ruiz, J. Paal, J. Lübeck, J. Strahwald, K. Buhr y C. Gebhardt. 2004. Tagging quantitative trait loci for maturity-corrected late blight resistance in tetraploid potato with PCR-based candidate gene markers. *Mol. Plant-Microbe. Interac.* 17(10), 1126-1138.
- Bradshaw, J.E., C.A. Hackett, R. Lowe, K. McLean, H.E. Stewart, I. Tierney, M.D.R. Vilaro y G.J. Bryan. 2006. Detection of a quantitative trait locus for both foliage and tuber resistance to late blight [*Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary] on chromosome 4 of a dihaploid potato clone (*Solanum tuberosum* subsp. *tuberosum*). *Theor. Appl. Genet.* 113(5), 943-951.

- Costanzo, S., I. Simko, B.J. Christ y K.G. Haynes. 2005. QTL analysis of late blight resistance in a diploid potato family of *Solanum phureja* x *S. stenotomum*. *Theor. Appl. Genet.* 111, 609-617.
- Díaz M., M., D.A. Fajardo, J.D. Moreno, C. García y V.M. Núñez. 2003. Identificación de genes *R1* y *R2* que confieren resistencia a *Phytophthora infestans* en genotipos colombianos de papa. *Rev. Colomb. Biotecnol.* 5(2), 40-50.
- El-Kharbotly, A., C. Leonards-Schippers, D.J. Huigen, E. Jacobsen, A. Pereira, W.J. Stiekema, F. Salamini y 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.
- Escallón, R., M. Ramírez y C.E. Nústez. 2005. Evaluación del potencial de rendimiento y de la resistencia a *Phytophthora infestans* (Mont. de Bary) en la colección de papas redondas amarillas de la especie *Solanum phureja* (Juz. et Buk.). *Agron. Colomb.* 23(1), 35-41.
- Espinal, C., H. Martínez, N. Pinzón y C. Barrios. 2005. La cadena de la papa en Colombia. Una mirada global de su estructura y dinámica 1991-2005. En: Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. Observatorio Agrociencias Colombia, <http://www.agrociencias.gov.co>; consulta: marzo de 2010.
- Estrada, N. 2004. La biodiversidad en el mejoramiento genético de la papa. Fundación Promoción e Investigación de los Productos Andinos (Proinpa); Centro Internacional de la Papa (CIP); Centro de Información para el Desarrollo (CID), La Paz.
- Ewing, E.E., I. Simko, C.D. Smart, M.W. Bonierbale, E.S.G. Mizubuti, G.D. May y W.E. Fry. 2000. Genetic mapping from field tests of qualitative and quantitative resistance to *Phytophthora infestans* in a population derived from *Solanum tuberosum* and *Solanum berthaultii*. *Mol. Breed.* 6, 25-36.
- FAO. 2010. Crops statistics database. En: <http://faostat.fao.org/>; consulta: septiembre de 2010.
- Gebhardt, C. y J.P.T. Valkonen. 2001. Organization of genes controlling disease resistance in the potato genome. *Annu. Rev. Phytopathol.* 39, 79-102.
- Gebhardt, C., A. Ballvora, B. Walkemeier, P. Oberhagemann y K. Schüler. 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. *Mol. Breed.* 13, 93-102.
- Ghislain, M., B. Trognitz, M. del R. Herrera, J. Solis, G. Casallo, C. Vásquez, O. Hurtado, R. Castillo, L. Portal y M. Orrillo. 2001. Genetic loci associated with field resistance to late blight in offspring of *Solanum phureja* and *S. tuberosum* grown under short-day conditions. *Theor. Appl. Genet.* 103, 433-442.
- Ghislain, M., D. Andrade, F. Rodríguez, R.J. Hijmans y D.M. Spooner. 2006. Genetic analysis of the cultivated potato *Solanum tuberosum* L. Phureja Group using RAPDs and nuclear SSRs. *Theor. Appl. Genet.* 113, 1515-1527.
- Grube, R.C., E.R. Radwanski y M. Jahn. 2000. Comparative genetics of disease resistance within the Solanaceae. *Genetics* 155, 873-887.
- Hahn, K. y G. Strittmatter. 1994. Pathogen-defence gene (*prpl-1*) from potato encodes an auxin-responsive glutathione S-transferase. *Eur. J. Biochem.* 226, 619-626.
- Huang, S., V.G.A.A. Vleeshouwers, J.S. Werij, R.C.B. Hutten, H.J. van Eck, R.G.F. Visser y E. Jacobsen. 2004. The *R3* resistance to *Phytophthora infestans* in potato is conferred by two closely linked *R3* genes with distinct specificities. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 17, 428-435.
- Huang, S. 2005. The discovery and characterization of the major late blight resistance complex in potato: genomic structure, functional diversity and implications. Tesis de doctorado. Universidad de Wageningen, Wageningen, The Netherlands.
- Kuhl, J.C., R.E. Hanneman y M.J. Havey Jr. 2001. Characterization and mapping of *Rpi1*, a late blight resistance locus from diploid (1EBN) Mexican *Solanum pinnatisectum*. *Mol. Genet. Genomics* 265, 977-985.
- Leonards-Schippers, C., W. Gieffers, R. Schaffer-Pregl, E. Ritter, S.J. Knapp, F. Salamini y C. Gebhardt. 1994. Quantitative resistance to *Phytophthora infestans* in potato: a case study for QTL mapping in allogamous plant species. *Genetics* 137, 67-77.
- Li, X., H.J. van Eck, J.N.A.M. Rouppe van der Voort, D.-J. Huigen, P. Stam y 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.
- Ligarreto, G. y M. Suárez. 2003. Evaluación del potencial de los recursos genéticos de papa criolla (*Solanum phureja*) por calidad industrial. *Agron. Colomb.* 21(1-2), 83-94.
- Malcolmson, J.F. y W. Black. 1966. New genes in *Solanum demissum* Lindl. and their complementary races of *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary. *Euphytica* 15, 199-203.
- Mirjam, M., J. Jacobs, B. Vosman, V.G.A.A. Vleeshouwers, R.G.F. Visser, B. Henken y R. van den Berg. 2010. A novel approach to locate *Phytophthora infestans* resistance genes on potato genetic map. *Theor. Appl. Genet.* 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.
- Naess, S.K., J.M. Bradeen, S.M. Wielgus, G.T. Haberland, J.M. McGrath y J.P. Helgeson. 2000. Resistance to late blight in *Solanum bulbocastanum* is mapped to chromosome 8. *Theor. Appl. Genet.* 101, 697-704.
- Niederhauser, J.S., J. Cervantes y L. Servin. 1954. Late blight in Mexico and its implications. *Phytopathol.* 44, 406-408.
- Nústez, C., S. Tinjacá y M. Cotes 2008. Respuesta a *Phytophthora infestans* en la colección del Grupo Phureja de la Universidad Nacional de Colombia. pp. 159-160. En: Memorias, XXIII Congreso de la Asociación Latinoamericana de la Papa y VI Seminario Latinoamericano de Uso y Comercialización de la Papa. Mar del Plata, Argentina.
- Oberhagemann, P., C. Chatot, R. Schäfer, D. Wegener, C. Palomino, F. Salamini, E. Bonnel y C. Gebhardt. 1999. A genetic analysis of quantitative resistance to late blight in potato: towards marker-assisted selection. *Mol. Breed.* 5, 399-415.
- Pajerowska, K., M. Shahid, N. Guex, V. Halim, S. Rosahl, I. Somssich y C. Gebhardt. 2008. Natural variation of potato *allene oxide synthase 2* causes differential levels of jasmonates and pathogen resistance in *Arabidopsis*. *Planta* 228, 293-306.

- Pajerowska, K., B. Stich, U. Achenbach, A. Ballvora, J. Lübeck, J. Strahwald, E. Tacke, H. Hofferbert, E. Ilarionova, D. Bellin, B. Walkemeier, R. Basekow, B. Kersten y C. Gebhardt. 2009. Single nucleotide polymorphisms in the *Allene Oxide Synthase* 2 gen. *Genetics* 181, 1115-1127.
- Park, T.-H., A. Gros, A. Sikkema, V.G.A.A. Vleeshouwers, M. Muskens, S. Allefs, E. Jacobsen, R.G.F. Visser y E.A.G. van der Vossen. 2005a. The late blight resistance locus *Rpi-blb3* from *Solanum bulbocastanum* belongs to a major late blight *R* gene cluster on chromosome 4 of potato. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 18, 722-729.
- Park, T.-H., V.G.A.A. Vleeshouwers, R.C.B. Hutten, H.J. van Eck, E. van der Vossen, E. Jacobsen y R.G.F. Visser. 2005b. High-resolution mapping and analysis of the resistance locus *Rpi-abpt* against *Phytophthora infestans* in potato. *Mol. Breed.* 16, 33-43.
- Park, T.-H., V.G.A.A. Vleeshouwers, E. Jacobsen, E. van der Vossen y R.G.F. Visser. 2009a. Molecular breeding for resistance to *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary in potato (*Solanum tuberosum* L.): a perspective of cisgenesis. *Plant Breed.* 128, 109-117.
- Park, T.-H., S. Foster, G. Brigneti y J.D.H. Jones. 2009b. Two distinct potato late blight resistance genes from *Solanum berthaultii* are located on chromosome 10. *Euphytica* 165, 269-278.
- Rauscher, G.M., C.D. Smart, I. Simko, M. Bonierbale, H. Mayton, A. Greeland y W.E. Fry. 2006. Characterization and mapping of *Rpi-ber*, a novel potato late blight resistance gene from *Solanum berthaultii*. *Theor. Appl. Genet.* 112, 674-687.
- Rickert, A., J. Kim, S. Meyer, A. Nagel, A. Ballvora, P. Oefner y C. Gebhardt. 2003. First-generation SNP/InDel markers tagging loci for pathogen resistance in the potato genome. *Plant Biotechnol. J.* 1, 399-410.
- Simko, I., S. Costanzo, V. Ramanjulu, B. Christ y K. Haynes. 2006. Mapping polygenes for tuber resistance to late blight in a diploid *Solanum phureja* x *S. stenotomum* hybrid population. *Plant Breed.* 125, 385-389.
- Simko, I., S. Jansky, S. Stephenson y D. Spooner. 2007. Genetics of resistance to pest and disease. pp. 116-155. En: Bradshaw, J., C. Gebhardt, F. Govers, D. Mackerron, M. Taylor y H. Ross (eds.). *Potato biology and biotechnology advances and perspectives*. Elsevier, Netherlands.
- Sliwka, J., H. Jakuezun, R. Lebecka, W. Marczewski, C. Gebhardt y E. Zimnoch-Guzowska. 2006. The novel, major locus *Rpi-phu1* for late blight resistance maps to potato chromosome IX is not correlated with long vegetation period. *Theor. Appl. Genet.* 113, 685-695.
- Sliwka, J., H. Jakuezun, P. Kaminski y E. Zimnoch-Guzowska. 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), 133-140.
- Smilde, W.D., G. Brigneti, L. Jagger, S. Perkins y J.D.G. Jones. 2005. *Solanum mochiquense* Chromosome IX carries a novel late blight resistance gene *Rpi-moc1*. *Theor. Appl. Genet.* 110, 252-258.
- Song, J., J.M. Braaden, S.K. Naess, J.A. Raasch, S.M. Wielgus, G.T. Haberlach, J. Liu, H. Kuang, S. Austin-Phillips, C.R. Buell, J.P. Helgeson y J. Jiang. 2003. Gene *RB* cloned from *Solanum bulbocastanum* confers broad resistance to potato late blight. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 9128-9133.
- Stewart, H.E. y J.E. Bradshaw. 2001. Assessment of the field resistance of potato genotypes with major gene resistance to late blight (*Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary) using inoculums comprised of two complementary races of the fungus. *Potato Res.* 44, 41-51.
- Turkensteen, L.J. 1993. Durable resistance of potatoes against *Phytophthora infestans*. pp. 115-124. En: Jacobs, Th. y J.E. Parlevliet (eds.). *Durability of disease resistance*. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, The Netherlands.
- Umaerus, V. y M. Umaerus. 1994. Inheritance of resistance to late blight. pp. 365-401. En: Bradshaw, J.E. y G.R. Mackay (eds.). *Potato genetics*. CAB International, Wallingford, UK.
- van der Vossen, E., A. Sikkema, B. Lintel, J. Gros, P. Stevens, M. Muskens, D. Wouters, A. Pereira, W. Stiekema y S. Allefs. 2003. An ancient *R* gen from the wild potato species *Solanum bulbocastanum* confers broad-spectrum resistance to *Phytophthora infestans* in cultivated potato and tomato. *Plant J.* 36, 867-882.
- van der Vossen, E.A.G., J. Gros, A. Sikkema, M. Muskens, D. Wouters, P. Wolters, A. Pereira y S. Allefs. 2005. The *Rpi-blb2* gene from *Solanum bulbocastanum* is an *Mi-1* gene homolog conferring broad-spectrum late blight resistance in potato. *Plant J.* 44, 208-222.
- Villarreal, H., P. Porras, A. Santa, J. Lagoeyte y D. Muñoz. 2007. Costos de producción de papa en las principales zonas productoras de Colombia. *Federación Colombiana de Productores de Papa (Fedepapa)*, Bogotá.
- Wastie, R.L. 1991. Breeding for resistance. pp. 193-224. En: Ingram, D.S. y P.H. Williams (eds.). *Advances in plant pathology*. Academic Press, London.