

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGIA, BIOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR



**Estudios genómicos para la localización de un
nuevo gen de resistencia extrema al *Virus X de la
Papa (PVX)* presente en *Solanum commersonii***

Tesis presentada para optar al título de
**DOCTOR DE LA UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
EN EL ÁREA: CIENCIAS BIOLÓGICAS**

LIC. MARÍA CAROLINA MARTÍNEZ

**DIRECTOR DE TESIS Y CONSEJERO DE ESTUDIOS:
DR. H. ESTEBAN HOPP**

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA
CNIA INTA – CASTELAR

Ciudad Autónoma de Buenos Aires, 2008

Estudios genómicos para la localización de un nuevo gen de resistencia extrema al *Virus X de la Papa* (PVX) presente en *Solanum commersonii*

Resumen

La papa (*Solanum tuberosum* L.) es un cultivo de gran importancia económica a nivel mundial siendo susceptible a muchas enfermedades. Los programas de mejoramiento para conferir resistencia frente a patógenos involucran la incorporación de genes a partir de especies silvestres relacionadas.

El virus X de la papa (PVX) es uno de los virus de mayor dispersión y más dañinos que afectan al cultivo. Recientemente, se aislaron nuevas cepas hipervirulentas como las HB y MS que son capaces de superar la resistencia conferida por los cultivares resistentes disponibles. En este contexto, nuestro grupo identificó en el germoplasma de *S. commersonii* una nueva fuente de resistencia extrema contra todas las cepas de PVX.

El objetivo de este trabajo fue caracterizar esta nueva fuente de resistencia extrema al PVX mediante el análisis de la herencia de la misma y a través de la identificación de la región cromosómica que contiene al gen de interés, utilizando diferentes estrategias genómicas.

Se estudió una población segregante de *S. commersonii* que fue analizada fenotípicamente frente a la infección por PVX empleando la cepa hipervirulenta MS. Este estudio demostró que la resistencia está conferida por un gen único y dominante al que se denominó Rx_{cmm} .

Posteriormente, mediante el empleo de marcadores moleculares y de distintas aproximaciones genómicas que contemplan la elevada sintenia entre las especies de la familia *Solanaceae*, se determinó que el gen Rx_{cmm} se localizaba en la región distal del brazo largo del cromosoma IX.

Esta localización es distinta a la descrita para los otros dos genes de resistencia extrema al PVX conocidos, postulándose que este gen podría ser renombrado como $Rx3$. Asimismo, el estudio de esta región cromosómica sugeriría que Rx_{cmm} está presente en un *cluster* de genes de resistencia a patógenos, tal como se ha observado en papa y en otras especies vegetales.

Palabras clave: resistencia a enfermedades, gen de resistencia, marcadores moleculares, mapeo genético, Rx , PVX, papa, *Solanum commersonii*, *Solanaceae*

Genomic studies for the localization of a new extreme resistance gene to *Potato Virus X (PVX) in Solanum commersonii*

Abstract

Potato (*Solanum tuberosum* L.) is an economic important crop worldwide, being susceptible to several diseases. In order to confer resistance against pathogens, breeding programs involve the incorporation of genes from wild related species.

Potato Virus X (PVX) is one of the most widespread and harmful virus infecting potatoes. Recently, several hypervirulent strains like HB and MS, that are capable to overcome the resistance conferred by the currently grown cultivars, have been isolated. In this context, our group identified a new source of extreme resistance to all PVX strains in *S. commersonii* germplasm.

The aim of the present study was to characterize this new PVX extreme resistance source through the evaluation of the genetic base of the resistance and the identification of the chromosomal region that encompass the gene of interest, using different genomic strategies.

Phenotyping analysis was conducted on a *S. commersonii* segregating population using hypervirulent PVX MS strain. This study showed that the resistance is conferred by a single and dominant gene, named Rx_{cmm} .

Further studies, using molecular markers and different genomic approaches based on the high synteny level among *Solanaceae* species, led to the localization of Rx_{cmm} gene in the distal end of the long arm of chromosome IX.

This chromosomal position is different from the two extreme resistance genes previously mapped, suggesting that this gene could be called $Rx3$. Likewise, the analysis of this chromosomal region suggests that Rx_{cmm} gene is localized in a disease resistance genes cluster, as it was reported in potato and other plant species.

Key words: disease resistance, resistance gene, molecular markers, genetic mapping, Rx , PVX, potato, *Solanum commersonii*, *Solanaceae*

AGRADECIMIENTOS

Sin la ayuda, el apoyo y sobre todo la amistad que recibí durante estos años, habría sido casi imposible realizar esta tesis. Por eso quiero agradecer a todos los que contribuyeron de una u otra manera a la concreción de esta etapa profesional que, inevitablemente, es también personal. Y, si me olvido de alguien, sepa disculpar mi deslíz.

- Al INTA, por su apoyo en la realización de este trabajo mediante el otorgamiento de una beca y, posteriormente, la incorporación a su planta de personal, dándome la posibilidad de formar parte de una Institución reconocida en el país y en el exterior. Especialmente gracias, al Dr. Osvaldo Rossetti y a la Dra. Elisa Carrillo.

- Al CONICET y a la ANPCyT que financiaron parte de este trabajo.

- Al Dr. Esteban Hopp, por haberme permitido integrar su grupo de trabajo y participar activamente en distintos proyectos, estimulando mi formación tanto académica como docente. Por facilitarme las cosas en tiempos de tormenta, confiando en mí aun cuando yo ya había perdido toda confianza.

- A la Dra. Norma Paniego, por poder contar con ella en todo momento, por su apoyo incondicional y desinteresado, por su generosidad y su tremenda capacidad, por mejorar mi trabajo a través de la discusión de resultados, por sus aportes en la escritura de esta Tesis, por sus charlas formales e informales. *No hubiera sobrevivido sin tu ayuda durante todo este tiempo. Ojalá algún día pueda devolverte (aunque sea una partecita) todo lo que me diste. Gracias!!*

- A la Dra. Susana Marcucci Poltri, porque es mi maestra desde los inicios, enseñándome a dar mis primeros pasos en el lab. Por estar siempre disponible para responder preguntas estadísticas y de las otras... Por ser un ejemplo de perseverancia. Por tus frases célebres siempre vigentes. *Gracias por escucharme!! Qué bueno es tenerte cerca ahora!!*

- A la Dra. Ruth Heinz, por su tranquilidad, confianza y tolerancia contagiosa. Por el buen trato, la experiencia y el conocimiento, que hace que todo sea más fácil y lo imposible se vuelva posible. Por su contención durante esta última etapa. *Gracias!!*

- A los Dres. Alejandro Tozzini y Diego Lijavetzky y a la Ing. Agr. M. Florencia Lucca por todo el trabajo compartido durante el inicio del proyecto. Por todo lo aprendido. *Gracias!*

- Al Dr. Guillermo Prata y a la Dra. María Laura Mayor de la Universidad Nacional de Rosario por facilitarme la adquisición de las semillas de tomate. A la Dra. Christiane Gebhardt por su colaboración en el trabajo de mapeo.

- A Ana Julia, por estar siempre ahí, lista para compartir la cotidianeidad del laboratorio y de la vida con la confianza de una hermana. Por ser coherente en tus pensamientos y tus actos. Por tu ayuda con los clonados y la escritura de “La Criatura”. *Gracias por ser mi amiga!!*

- A Luis, por las mil y un búsquedas bibliográficas; por los momentos compartidos, por tu sinceridad y tu paciencia. *Gracias por toda tu ayuda!!*

- A Vero Nishi, por todo lo que me ayudaste sin siquiera yo pedirte. Siempre tenés todas las respuestas a todos mis pedidos. Sos un ángel de la guarda en el lab. *Gracias por todo!!*

- A Paula F, por tu sonrisa y esa sensación de mirarse y saber lo que el otro piensa como si no hicieran falta las palabras. Por tu hablar pausado y sincero que calma mi loca ansiedad. *Gracias por estar ahí!!*

- A Andrea (Apu) por todo tu asesoramiento técnico y tus experiencias de vida. Sos un ejemplo de mujer!! *Gracias por poder contar con vos!*

- A Paola y Dani, por mostrarme la otra cara de la moneda. Por su entusiasmo en hacer cosas. Porque siempre me dejan pensando. *Gracias por la diversidad de opinión y por todos sus ofrecimientos de ayuda!!*

-
- A Flor dV y a Cori, por su entusiasmo. Por recordarme y contagiarme día a día las ganas de hacer experimentos. Por su ayuda en las instancias finales de este trabajo. Por mantenerme actualizada con la música, la tele, las tribus, etc, etc. *Gracias por poder contar con Uds.!!*
 - A Marisa LB, por tus charlas y anécdotas. Por estar ahí, dispuesta a dar una mano y siempre tirar para adelante. *Gracias!!*
 - A las chicas del grupo TEM: Tere, Vale B, Nilda, Vale P, por cuidar directa o indirectamente a mis plantitas *in vitro*. A Andrea D, que también lo hizo en el pasado. *Gracias a todas por ayudarme y atender mis pedidos!!*
 - A los chicos del Inverno: Nacho, Matías y especialmente a Agus. Sin todo su trabajo esta Tesis nunca se hubiera terminado. *Gracias por estar siempre listos para ayudar!!*
 - A los chicos del secuenciador: Pablo y Marianne por su ayuda. *Gracias por dejarme interrumpirlos!!*
 - A todos los integrantes del grupo Plantas en general (a los nuevos y a los de siempre, a los que se fueron al interior o al exterior y ya no están en el lab) y, en particular, a Ceci V, Ari (*gracias por ayudarme a recuperar el PVX!*), Laura Rd, Laura Rm, Ramón (*gracias por la membrana!*), Martín G (*gracias por el auxilio con el mapmaker!!*) y Betiana por su apoyo y ayuda durante todo este tiempo.
 - A los chicos de GMO, especialmente a Marce por todas las charlas y risas compartidas. *Gracias!!*
 - A todos los integrantes del grupo Virus por su buena onda. Especialmente a Oscar por estar siempre atento a lo que me pasa y tenerme en cuenta, por tu estímulo para que terminara esta Tesis. A Gabi C por transmitirme confianza y palabras de aliento en esta parte final del trabajo. A Andrea P por darme siempre una mano, a Guido por las sugerencias varias y a Flor F por preguntar “y la tesis?”. *Mil gracias!!*
 - A todos los integrantes del grupo Bacterias. A los “tuberculosos”, especialmente a Martín, Kari, Andrea, Paz, Vero B, Alicia y Virgi. *Gracias por su apoyo y por permitirme compartir gratos momentos juntos!!* A los “brucelosos”, especialmente a Silvio por todas tus acertadas afirmaciones, tus charlas y sugerencias, por ser un maestro. *Gracias!!* A Marcos, Julia, Mariela, Haydee y Alicia, por las charlas y anécdotas compartidas. *Gracias!!*
 - A todos los integrantes del grupo hemoparásitos. Especialmente a Marisa por tu franqueza, a Paula R por hacerme reír con tus ocurrencias, a Silvi por el estímulo y a Romi por tu sonrisa incondicional. *Gracias!!*
 - A Jorge, Isabel, Fabián, Vilma, Majo, Roxana, Graciela y Vale, por todo el apoyo técnico sin el cual este trabajo no se hubiera podido hacer. *Gracias por su buena disposición para ayudar!*
 - A las secres del Instituto: Perla, Sandra, Cintia y Cristina, por todo el apoyo administrativo.
 - A todo el personal de apoyo y administrativo del CICVyA, especialmente a las bibliotecarias, telefonistas y a los chicos de mantenimiento. *Gracias!!*
 - A Viviana B, Laura G y Rosanna P, por permitirme participar en sus proyectos. *Gracias por su paciencia durante este tiempo!!*
 - A mis compañeros de docencia en Exactas, especialmente a Mónica, Luis y Diana. *Gracias por contagiarme su entusiasmo por enseñar!!*
 - A mis amigos (por orden de aparición en mi vida): Silvina, Pame, Javier G, Supa, Alo, Gabi, Sabri, Ana, Pablo, Guille, Enrique, y a sus respectivas familias (esposas, especialmente a Sonia, esposos e hijos,) que me acompañaron y ayudaron en los momentos difíciles, haciendo que mi vida se llene de color. *Gracias!!*
 - A Darío, por la amistad compartida.
 - A mis profes de tango Ernesto y Stella y todos mis compañeros, especialmente a Cris, Jose, Cacho y Zule, por todos los momentos compartidos y por su cariño. *Gracias por ayudarme a explorar otra faceta de mi vida!!*

•A Juan, por tu paciencia y tolerancia. *Gracias por todo lo que me brindaste durante los comienzos de este trabajo.*

•A mi mamá, por toda tu ayuda y apoyo, por tu ejemplo de fortaleza ante los cambios de la vida y por tus comportamientos típicos de madre... aunque a veces exageres. *Gracias!!*

•A mis hermanas, Betina y María José, por tratar de entenderme, interesarse por mí y soportarme incondicionalmente. *Gracias por quererme y aceptarme como soy!!*

•A mis tres sobrinos mimados porque son la alegría de mi vida. A Delfina, por tus charlas y observaciones que ponen a prueba mis conocimientos basados en los libros, por compartir el gusto por dibujar (y tener) gatos y por las miradas compinches. A Iñaki, por tus ocurrencias pícaras y, por mantenerme entrenada en mil juegos con pelota y avioncitos. A Martina, por contagiarme tu energía, por dejarme que te lea cuentos y te invente juegos, por querer “todo”... como yo. *Gracias por dejarme influir un poquitito en sus pequeñas vidas!!*

•A mi cuñado Daniel, por tu interés en mi trabajo y tus chistes sarcásticos que son un desafío. *Gracias por hacerme reír!*

•A mi primo Juan Manuel, por tus diálogos e historias de vida, por estar siempre dispuesto a ayudarme en lo que necesite. *Gracias por desasnarme!!*

•A toda mi familia: a los que están y sin los que nunca estaría donde estoy, y a los que se marcharon pero siempre llevaré conmigo, especialmente a mis tíos Mary y Negro.

•A mi papá, a quien le debo una gran parte de lo que soy... bueno, al menos un 50% de mis genes. *Sé que estás compartiendo conmigo este momento!*

•A Oswald, por no dejarme caer, por tu apoyo, tu amor, por tu capacidad para escuchar, por las charlas compartidas, por tus cuentos e historias delirantes, por la música, el baile y los asados, por el “de vez en cuando”, por hacerme reír aún en los peores momentos, por acompañarme para que yo pueda hacer “todo”, por toda la ayuda durante este tiempo y miles de cosas más que no entran en un párrafo. Y, finalmente, por tus sugerencias para la escritura de la tesis que, por razones obvias, no pudieron ser incluidas:

“Podés poner algo así: Mientras me encontraba en el laboratorio, analicé muchas celulitas, sí muchas. Algunas se resistían a la transformación genética que yo quería imponerles, se reservaban para algo mejor. Pero yo no podía descubrirlo. Pasaron unos instantes, que me parecieron horas... logré extraer el jugo elemental de la vida. Sí, ese que se llama ADN. Ese que hace que cada papa sea un ser único e irrepetible... pero... ¿irrepetible?... No, no tanto ya. Porque con ese jugo de la vida yo buscaba eso, su esencia, su replique... y lo logré...”



(Tomado de Liniers, 2007)

A mi mamá, con todo mi cariño

1. ÍNDICE

Resumen.....	i
Abstract.....	ii
AGRADECIMIENTOS.....	iii
1. ÍNDICE.....	A
2. ABREVIATURAS, ACRÓNIMOS Y SIGLAS.....	1
3. INTRODUCCIÓN.....	5
3.1. El cultivo de la papa (<i>Solanum tuberosum</i>).....	5
3.1.1. Descripción del taxón.....	5
3.1.2. Origen de la papa.....	6
3.1.3. Importancia económica del cultivo.....	7
3.1.4. La papa: "alimento del futuro".....	8
3.1.5. El cultivo de la papa en la Argentina.....	9
3.2. El Virus X de la Papa (PVX, <i>Potato Virus X</i>) y los genes de resistencia a este virus.....	10
3.2.1. Enfermedades que afectan al cultivo: el PVX y la necesidad de contar con fuentes de resistencia.....	10
3.2.2. La interacción planta-patógeno.....	13
3.2.3. Tipos de resistencia a virus en papa y nomenclatura.....	14
3.2.4. Los genes de resistencia <i>Nx</i> , <i>Nb</i> y <i>Rx</i>	15
3.2.5. Interacción entre las cepas de PVX y los genes de resistencia.....	16
3.2.6. La resistencia a PVX MS presente en <i>S. commersonii</i>	19
3.3. Los genes y las proteínas de resistencia en <i>Solanaceae</i>.....	20
3.3.1. Los genes <i>R</i> y la clasificación de las proteínas R codificadas por éstos.....	21
3.3.2. Factores de avirulencia de genes <i>R</i>	23
3.3.3. Respuesta mediada por la interacción R-Avr: <i>Rx</i> de papa y CP de PVX como sistema modelo.....	24
3.3.4. Distribución y origen de los genes <i>R</i>	25
3.4. Herramientas para realizar estudios genómicos en plantas en general y en <i>Solanaceae</i> en particular.....	28
3.4.1. Los marcadores moleculares.....	28
3.4.1.1. Polimorfismos en la longitud de fragmentos de restricción (RFLP).....	29
3.4.1.2. ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD).....	30
3.4.1.3. Polimorfismos de longitud de fragmentos amplificados (AFLP).....	32
3.4.1.4. Métodos basados en PCR sitio específica marcadores CAPS y SCAR.....	34
3.4.1.5. Microsatélites o Repeticiones de Secuencias Simples (SSR).....	35
3.4.1.6. Análogos a genes de resistencia (RGA).....	37
3.4.1.7. Marcadores derivados de Secuencias Expresadas (ESTs).....	39
3.4.2. Los mapas genético-moleculares de referencia en papa y en otras solanáceas.....	41
3.4.3. El Análisis de Grupos de Segregantes (BSA) para el mapeo de <i>loci</i> de herencia simple.....	42
3.4.4. Las Líneas Introgresadas (ILs) de tomate.....	44
3.4.5. La genoteca de grandes insertos de <i>S. bulbocastanum</i>	45
3.4.6. Los proyectos de secuenciación del genoma de tomate y papa.....	46
4. OBJETIVOS.....	47
4.1. Objetivo general.....	47
4.2. Objetivos específicos.....	47
5. HIPÓTESIS.....	49
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	50

6.1. Material vegetal	50
6.2. Raza viral utilizada para evaluar la resistencia	52
6.3. Cultivo de las plantas	52
6.4. Preparación del inóculo e infección de las plantas	53
6.5. Determinación del grado de infección mediante detección inmunológica-ELISA	53
6.6. Extracción de ADN	54
6.7. Análisis de segregación en mezclas de ADN (BSA <i>Bulked Segregant Analysis</i>)	54
6.8. Análisis mediante RAPD	55
6.9. Análisis mediante AFLP	58
6.9.1. Digestión y ligación.....	59
6.9.2. Pre-amplificación.....	59
6.9.3. Amplificación final.....	60
6.9.4. Separación de los fragmentos de amplificación mediante electroforesis.....	62
6.10. Análisis mediante RGAs	63
6.11. Análisis mediante AFLP-RGA	64
6.12. Transformación de marcadores AFLP y/o RGA en marcadores tipo SCAR	65
6.12.1. Aislamiento de fragmentos de ADN de geles de poliacrilamida.....	65
6.12.2. Clonado de los fragmentos aislados.....	66
6.12.3. Secuenciación de fragmentos clonados.....	66
6.12.4. Condiciones de amplificación del marcador RGA(584) como un marcador SCAR.....	67
6.13. Análisis mediante RFLP	67
6.13.1. Restricción, electroforesis y transferencia.....	67
6.13.2. Marcación de la sonda, hibridación y autorradiografía.....	68
6.14. Análisis mediante SSR	69
6.15. Análisis de marcadores (SCAR, CAPS, EST) disponibles a partir de la literatura	70
6.16. Análisis de una genoteca de BACs de <i>S. bulbocastanum</i>	72
6.16.1. Análisis de la genoteca con el marcador RGA(584) empleado como sonda.....	72
6.16.2. Purificación y caracterización de clones de interés de la genoteca.....	74
6.17. Amplificación de homólogos a genes <i>Rx</i>	75
6.18. Análisis estadístico y bioinformático de los datos	76
6.18.1. Análisis de ligamiento.....	76
6.18.2. Análisis de secuencias nucleotídicas.....	77
7. RESULTADOS	80
7.1. Evaluación de fenotípica de las poblaciones por su resistencia a la infección con PVX MS	80
7.2. Análisis de segregación en mezclas de ADN (BSA <i>Bulked Segregant Analysis</i>)	81
7.3. Análisis de segregantes agrupados (BSA) empleando marcadores ligados a otros genes de resistencia a PVX ya mapeados	82
7.4. Análisis de segregantes agrupados (BSA) con marcadores RAPD	84
7.5. Análisis de segregantes agrupados (BSA) con marcadores AFLP	85
7.6. Un marcador de AFLP ligado al gen <i>Rx_{cmm}</i>	86
7.7. Análisis de grupos de segregantes (BSA) mediante RGAs	89
7.8. Dos marcadores RGA ligados al gen <i>Rx_{cmm}</i>	92
7.9. Análisis mediante marcadores AFLP-RGA	94
7.10. Clonado de los fragmentos RGA polimórficos obtenidos	96
7.11. Análisis del marcador RGA(584)	96
7.11.1 Análisis de la secuencia del fragmento RGA clonado.....	96
7.11.2. Análisis de una genoteca de BAC de <i>S. bulbocastanum</i> con el marcador RGA(584).....	98
7.12. El marcador RGA(584) como sonda de RFLP	103
7.12.1. Empleo del marcador RGA(584) como sonda de RFLP en <i>S. commersonii</i>	103
7.12.2. Localización cromosómica del marcador RGA(584) en el mapa de referencia de papa.....	104
7.13. Búsqueda de marcadores informativos adicionales a partir del mapa de microsatélites de papa	106
7.14. Análisis de homólogos a genes <i>Rx</i> ya clonados	106
7.15. Confirmación de la localización cromosómica del gen <i>Rx_{cmm}</i> mediante el empleo de líneas introgresadas de tomate	109
7.16. Análisis de marcadores moleculares específicos de la región de interés, generados a partir de mapas o trabajos de mapeo en distintas especies de <i>Solanum</i>	127

7.16.1. Análisis exploratorio de marcadores moleculares del cromosoma IX, aislados de distintas especies de <i>Solanum</i> , para la búsqueda de polimorfismo en <i>S. commersonii</i>	116
7.16.2. Análisis del marcador CT220 en la población de <i>S. commersonii</i>	119
7.17. Construcción de un mapa de ligamiento de los marcadores hallados ligados al gen de resistencia a PVX MS presente en <i>S. commersonii</i>, Rx_{cmm}, anclado en cromosoma IX.....	120
8. DISCUSIÓN	121
8.1. El análisis fenotípico	121
8.2. Segregación de la resistencia al PVX MS	122
8.3. Análisis de segregantes agrupados (BSA) empleando marcadores ligados a otros genes de resistencia a PVX ya mapeados	123
8.4. Análisis de grupos de segregantes (BSA) con marcadores RAPD.....	124
8.5. Análisis de grupos de segregantes (BSA) con marcadores AFLP	125
8.6. Un marcador AFLP ligado al gen de resistencia extrema, Rx_{cmm} , a PVX MS.....	126
8.7. Análisis de grupos de segregantes (BSA) mediante RGAs.....	128
8.8. Dos marcadores RGA ligados al gen de resistencia extrema a PVX Rx_{cmm}	130
8.9. Análisis mediante marcadores AFLP-RGA.....	131
8.10. Análisis del marcador RGA(584).....	132
8.11. Búsqueda de marcadores informativos adicionales a partir del mapa de microsatélites de papa	138
8.12. Análisis de homólogos a genes Rx ya clonados	138
8.13. Confirmación de la localización cromosómica del gen Rx_{cmm} mediante el empleo de líneas introgradadas de tomate	140
8.14. Análisis de marcadores moleculares específicos de la región del cromosoma IX, generados a partir de mapas o trabajos de mapeo en distintas especies de <i>Solanum</i>	141
8.15. Mapeo del gen de resistencia extrema a PVX presente en <i>S. commersonii</i> Rx_{cmm} en cromosoma IX.....	143
9. CONCLUSIONES.....	146
10. BIBLIOGRAFÍA.....	148

2. ABREVIATURAS, ACRÓNIMOS Y SIGLAS

°C	grados centígrados
μCi	microCurie
μg	microgramo/s
μl	microlitro/s
μM	micromolar
AcONa	Acetato de Sodio
AcONH ₄	Acetato de Amonio
ADN	ácido desoxirribonucléico
ADNc	ADN copia
AFLP	<i>Amplified Fragment Length Polymorphism</i> , Polimorfismo en la longitud de los Fragmentos Amplificados
ARN	ácido ribonucléico
ARNm	ARN mensajero
ATP	adenosin 5'-trifosfato
BAC	<i>Bacteria Artificial Chromosome</i> , Cromosoma Artificial Bacteriano
BrEt	bromuro de etidio
BSA	seroalbúmina bovina o albúmina sérica bovina
BSA	<i>Bulked Segregant Analysis</i> , Análisis de Segregantes Agrupados o Análisis de Grupos de Segregantes o Análisis de Mezclas de Segregantes
CAPS	<i>Cleaved Amplified Polymorphic Sequence</i> , Secuencia Polimórfica Amplificada y Clivada
cm	centímetro/s
col.	colaboradores
CTAB	<i>Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide</i> , bromuro de cetiltrimetilamonio
cv.	cultivar
dATP	desoxiadenina trifosfato
dCTP	desoxicitosina trifosfato
DNA	<i>DeoxyriboNucleic Acid</i> , ver ADN
dNTP	desoxinucleósidos trifosfato
DO	densidad óptica
DTT	1,4 ditiotreitól
eds.	editores
EDTA	<i>ethylene-diamine-tetraacetic acid</i> , ácido etilendiaminotetraacético

EEA	Estación Experimental Agropecuaria
ELISA	<i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i> , Ensayo de enzima ligada a un inmunoadsorbente
EST	<i>Expressed Sequence Tag</i> , Secuencia Expresada
EUA	Estados Unidos de América
g	gramo/s o gravedad
ha	hectárea
hs	hora/horas
IL	<i>Introgression Line</i> , Línea Introgresada
IPTG	isopropil-1-tio- β -D-galactósido
ISSR	<i>Inter-Simple Sequence Repeats</i> , Entre Repeticiones de Secuencia Simple o Microsatélite Anclado
J	Joules
kb	kilobase/s
kDa	kiloDaltons
kg	kilogramo/s
l	litro/s
LB	medio de Luria Bertani
LOD	<i>Log Of Odds</i> , Logaritmo de las probabilidades
m	metro/s
M	Molar
mA	miliamper
mg	miligramo/s
min	minuto/s
ml	mililitro/s
mM	milimolar
Mb	Megapares de bases
m/v	masa en volumen
nCi	nanoCurie
ng	nanogramo/s
nm	nanometro/s
nt	nucleótido/s
ORF	<i>Open Reading Frame</i> , Marco Abierto de Lectura
PAES	<i>polyanethol sulphonic acid</i> , ácido polianetolsulfónico
pb	par/pares de bases
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> , Reacción en Cadena de la Polimerasa
PFGE	<i>Pulsed Field Gel Electrophoresis</i> , Electroforesis en Gel de Campo Pulsado

PVP	polietilenglicol
PVX	<i>Potato Virus X</i> , Virus X de la Papa
QTL	<i>Quantitative Trait Loci</i> , Loci de Caracteres Cuantitativos
RAPD	<i>Random Amplified Polymorphic DNA</i> , ADN Polimórfico Amplificado al Azar
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i> , Polimorfismo en el Largo de los Fragmentos de Restricción
RGA	<i>Resistance Gene Analogs</i> , Análogos a Genes de Resistencia
rpm	revoluciones por minuto
SCAR	<i>Sequence Characterized Amplified Region</i> , Región Amplificada de Secuencia Caracterizada
SDS	<i>Sodio Dodecil Sulfate</i> , dodecil sulfato de sodio
Sec	secuencia
seg	segundo/s
s.n.m.	sobre el nivel del mar
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i> , Polimorfismo de un Solo Nucleótido
spp.	subespecie
SSC	<i>Saline Sodium Citrate</i> , Citrato de Sodio Salino
SSR	<i>Simple Secuence Repeats</i> , Repeticiones de Secuencia Simple o Microsatélites
STS	<i>Sequence Tagged Sites</i> , Sitios de Secuencia Blanco o Sitios de Secuencia Definidos
TAE	Buffer Tris Acetato EDTA
TBE	Buffer Tris Borato EDTA
Tm	temperatura de <i>melting</i> (temperatura de hibridación de los iniciadores)
tn	tonelada/s
Tris	Tris (hidroximetil)-aminometano
U	unidades enzimáticas
UV	ultravioleta
v/v	volumen en volumen
V	voltios
W	watts
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactósido
YAC	<i>Yeast Artificial Chromosome</i> , Cromosoma Artificial de Levadura

3. INTRODUCCIÓN

3.1. El cultivo de la papa (*Solanum tuberosum*)

3.1.1. Descripción del taxón

La papa cultivada (*Solanum tuberosum* L. ssp. *tuberosum*) pertenece a la familia *Solanaceae*, sección Tuberarium. A esta familia también pertenecen otros cultivos de gran importancia como el tomate (*S. lycopersicum*), la berenjena (*S. melongena*), el pimiento (*Capsicum* sp.), la petunia (*Petunia* sp.), el tabaco (*Nicotiana tabacum*) y plantas de interés medicinal (Herrera-Arellano y col., 2004) entre otros (Lee, 2006).

En el género *Solanum* hay unas 2.000 especies, de las cuales tuberizan aproximadamente 200. El número básico de cromosomas es $x=12$, las especies pueden ser desde diploides ($2n=2x=24$) hasta hexaploides ($2n=6x=72$). La papa cultivada es una planta anual, de 30 a 100 cm de alto, que se propaga vegetativamente mediante tubérculos (**Figura 1**). Es un tetraploide ($2n=2x=48$) altamente heterocigota, con patrones de herencia tetrasómicos (Cadman, 1942; Howard, 1970). Sin embargo, podría ser un alotetraploide parcial mas que un autotetraploide verdadero, con las consecuentes desviaciones de los patrones de segregación tetrasómicos esperados (Bradshaw, 1994).

A nivel diploide, la papa es usualmente autoincompatible; mientras que a nivel tetraploide puede no serlo, encontrándose cierto grado de autofecundación espontánea. Sin embargo, la obtención de líneas endocriadas y, por lo tanto de F_2 o retrocruzas entre ellas, se ve impedida tanto a nivel diploide como tetraploide por la autoincompatibilidad y la alta carga genética presente en esta especie de reproducción vegetativa. Así, el mejoramiento tradicional de la papa se ve dificultado por la herencia tetrasómica de los caracteres, la alta heterocigosis, la autoincompatibilidad y la androesterilidad de muchos cultivares.

Sin embargo, se han introducido por cruzamiento genes en *S. tuberosum* spp. *tuberosum* a partir de varias especies silvestres de *Solanum* (Davidson, 1980; Ross, 1986; Bradshaw y Mackay, 1994; Camadro, 1996), la mayoría de las cuales son diploides o aloploploides en los cuales la herencia es disómica (Cockerham, 1970; Ross, 1986). Esto pone en evidencia la importancia de las especies silvestres como fuente de caracteres de interés (Hawkes, 1977; Gebhardt y col., 2004).

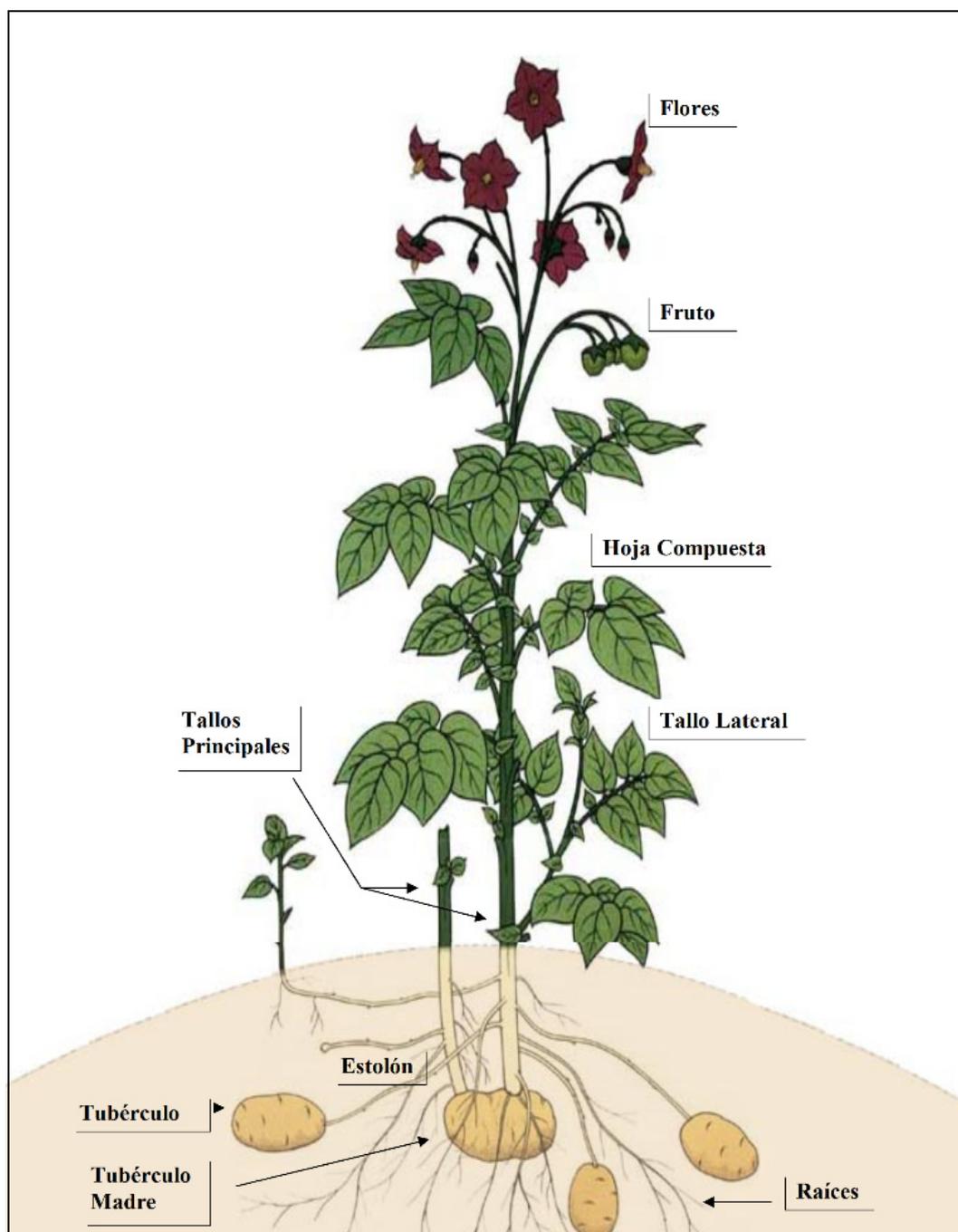


Figura 1. Planta de papa. (Tomado de www.potato2008.org/es/lapapa/index.html)

3.1.2. Origen de la papa

La papa es una especie originaria de América del Sur. Se considera al altiplano peruano-boliviano como su centro primario de origen (centro de origen de *S. tuberosum* ssp. *andigena*) y al archipiélago de Chiloé, en el sur de Chile, como centro secundario (origen

de *S. tuberosum* ssp. *tuberosum*). Estas subespecies tetraploides habrían evolucionado a partir de especies diploides (Bradshaw y Mackay, 1994).

En el continente americano hay unas 200 especies de papas silvestres, pero fue en los Andes centrales donde los agricultores lograron seleccionar y mejorar el primero de lo que habría de convertirse, en los milenios siguientes, una asombrosa variedad de cultivos del tubérculo. En realidad, lo que hoy se conoce como "papa" (*Solanum tuberosum* ssp. *tuberosum*) contiene apenas un fragmento de la diversidad genética de las siete especies reconocidas de papa y las 5.000 variedades que se siguen cultivando en los Andes.

La papa se originó hace unos 8.000 años y era ampliamente cultivada en Sudamérica a la llegada de la colonización española. El cultivo fue exportado a Europa (posiblemente a España y luego a Inglaterra) hacia fines del siglo XVI, desde donde se extendió al resto del mundo durante los dos siglos siguientes (Brown, 1990; Lee, 2006). En Sudamérica, la producción permaneció restringida a las regiones de mayor altitud hasta los comienzos del siglo XX, empleándose en la misma métodos tradicionales de muy baja productividad (Ross, 1986).

Actualmente, en América, el área de distribución geográfica del género *Solanum* se extiende desde los 40° de latitud N hasta los 40° de latitud S, desde el nivel del mar hasta los 4.500 m s.n.m., especialmente en el sector andino del continente. Las especies adaptadas a las distintas condiciones ecológicas de esta región, son una fuente de variabilidad genética importante para su uso en los planes de mejoramiento.

3.1.3. Importancia económica del cultivo

La papa, con su elevado contenido de almidón, es el cuarto cultivo alimenticio a nivel mundial, detrás del maíz, el trigo y el arroz. Sin embargo, su producción en materia seca y de proteína por unidad de área y tiempo es superior a la de los cultivos antes mencionados. En este sentido, el cultivo presenta las ventajas de ser altamente intensivo y remunerativo, con rendimientos que alcanzan las 3,6 tn/ha de materia seca. Los rendimientos en calorías (7,1 millones de kcal/ha) y en proteínas (196 kg/ha) se comparan favorablemente con los de los cereales. Además, debido a un ciclo reproductivo más corto, estos rendimientos resultan también competitivos frente a los de otras tuberosas y raíces (Ross, 1986). Su proteína es particularmente valiosa ya que posee un alto contenido de aminoácidos esenciales, muy raro en otras proteínas de reserva vegetales. Es rica en vitaminas B y C, hidratos de carbono, hierro, azufre, fósforo, sodio y potasio.

Debido a las ventajas mencionadas, y ante la creciente demanda mundial de alimentos y la crítica situación en que se debaten muchos países no desarrollados, el interés por la producción de este cultivo es motivo de renovado interés.

El sector mundial de la papa atraviesa grandes cambios. Hasta inicios del decenio de 1990, casi la totalidad de las papas se producían y consumían en Europa, América del Norte y en los países de la antigua Unión Soviética. Desde entonces se ha producido un espectacular aumento de la producción y la demanda de papa en Asia, África y América Latina, donde la producción aumentó de menos de 30 millones de toneladas a principios del decenio de 1960 a más de 165 millones en 2007. En 2005, por primera vez, la producción de papa del mundo en desarrollo excedió a la del mundo desarrollado. China se ha convertido en el primer productor mundial de papa, y poco menos de una tercera parte de todas las papas hoy se cosechan en China e India (FAOSTAT, 2008).

Asia consume casi la mitad del suministro mundial de papa pero, considerando su enorme población, el consumo por persona fue de apenas 25 kilogramos en 2005. Los mayores consumidores de papa son los europeos (96 kg/persona). El consumo más bajo es en África (14 kg/persona) y América Latina (23 kg/persona), pero está en aumento (FAOSTAT, 2008).

Las estadísticas de consumo disponibles demuestran que existe un amplio espacio potencial para incrementar la participación de la papa en la alimentación primaria de los países en desarrollo. En estos países, la papa es considerada una producción de “alta inversión”. Esto se debe a la necesidad del control de plagas, la disminución en el uso de mano de obra intensiva, la disminución de la cantidad y uso de herramientas y la renovación menos frecuente de la semilla comprada o de producción propia por parte del productor que son las principales variables que inciden sobre los costos de producción. Por esta razón, muchos pequeños productores no pueden reunir los medios para comprar los insumos necesarios para mejorar los rendimientos, tales como papa-semilla de buena calidad, fertilizantes y herbicidas (FAOSTAT, 2008).

3.1.4. La papa: “alimento del futuro”

En un contexto mundial de aumento de los precios de los alimentos, impulsados por la feroz competencia por el suministro internacional reducido de trigo, maíz y arroz, así como otros productos agrícolas. Conforme aumenta la preocupación de que pudiera producirse escasez de alimentos e inestabilidad en docenas de países de bajos ingresos, la atención

mundial se vuelve hacia un cultivo milenario que podría contribuir a aliviar la presión de la inflación de los precios de los alimentos, como es el caso de la papa. A diferencia de los principales cereales, sólo una parte del total de la producción de la papa entra en el comercio internacional y los precios por lo general se determinan por los costos locales de producción y no por las fluctuaciones del mercado mundial. Por lo tanto, es un cultivo muy recomendado para la seguridad alimentaria que puede ayudar a los agricultores de bajos ingresos y a los consumidores vulnerables a atravesar el momento de inestabilidad que experimentan hoy el suministro y la demanda mundial de alimentos

En la Conferencia bienal de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), celebrada en noviembre de 2005, el Representante Permanente del Perú propuso una resolución, aprobada por la Conferencia, para dirigir la atención mundial a la importancia de la papa como medio para dar seguridad alimentaria y reducir la pobreza. Esta resolución se transmitió al Secretario General de las Naciones Unidas, con el objetivo de que la Asamblea General de la ONU declarara **2008 Año Internacional de la Papa** (AIP) (<http://potato2008.org>).

La 16ª reunión de la Asamblea General aceptó la resolución en diciembre de 2005 e invitó a la FAO a facilitar la ejecución del AIP 2008. La resolución señala que la papa es un alimento básico en la alimentación mundial y confirma la función que este producto puede desempeñar en el cumplimiento de los objetivos de desarrollo establecidos, incluidos los Objetivos de Desarrollo del Milenio (FAO, 2008).

3.1.5. El cultivo de la papa en la Argentina

Si bien en el occidente de Argentina hay papas silvestres, la producción de este tubérculo data de 1870, según está documentado, cuando se cultivaron 2.000 hectáreas de tubérculos importados, casi sin duda, de Europa. Hoy en día, la producción de papa es en gran escala y muy mecanizada.

Desde inicios del decenio de 1960 la cosecha nacional promedia unos dos millones de toneladas, y a veces supera esta cifra (como en 1998, cuando fue de 3,4 millones de toneladas). Los niveles de consumo de papa, de unos 44 kilogramos por persona al año en 2005, también se han modificado poco desde 1990 (<http://www.argenpapa.com.ar>).

Lo que ha cambiado notablemente es la productividad. Junto a una caída constante del tamaño de la zona cosechada, de 200.000 hectáreas en 1961 a unas 68.000 en 2007, la producción por hectárea se ha triplicado con creces a casi 30 toneladas. En 2005, Argentina

exportó 33.000 toneladas de papas, y 4.000 toneladas de harina de papa, si bien la producción se destina principalmente al mercado interno donde el consumo anual *per capita* es uno de los más altos de Latinoamérica.

En el país se produce papa en una región que abarca desde Salta y Jujuy hasta Chubut, en la que se planta en diferentes épocas (de julio a febrero), según la zona productora, garantizando la llegada del producto fresco a los mercados consumidores durante todo el año. La gran amplitud de climas, altitudes y latitudes permite disponer de diversas calidades. La principal región de producción (21.000 ha en 2002/2003) está localizada en el sudeste de la Provincia de Buenos Aires, en el área denominada Balcarce, que reúne condiciones favorables para el cultivo obteniéndose un mayor rendimiento (750 bolsas/ha). Si bien, es en la Pcia. de Córdoba donde se concentra la mayor superficie plantada (40.000 ha) con rendimientos menores (500 bolsas/ha) (Mosciaro, 2004).

La superficie nacional total dedicada a esta cosecha es de alrededor de 100.000 ha en 2001, registrándose una producción total de 2-2,5 millones de tn y un rendimiento promedio de 24,7 tn/ha (Mosciaro, 2004). De la producción obtenida, un 82% se destina al consumo en fresco, un 9% a la producción de papa semilla, un 0.7% a exportaciones y un 9% a la industria. Las variedades más utilizadas para el consumo son Spunta (90% del mercado), de origen holandés, Kennebec (entre 4% y 7%), y otras variedades como Huinkul MAG, Shepody, Russet y Bonaerense La Ballenera, que son producidas en porcentajes menores para el consumo fresco y su procesamiento industrial (Mosciaro, 2004). Excepto Huinkul MAG, en la que se introdujo tolerancia a campo a PVY (*Potato Virus Y, Virus Y de la Papa*), estas variedades son susceptibles a virus y otros patógenos en mayor o menor medida (Vigliola, 1986).

3.2. El Virus X de la Papa (PVX, *Potato Virus X*) y los genes de resistencia a este virus

3.2.1. Enfermedades que afectan al cultivo: el PVX y la necesidad de contar con fuentes de resistencia.

La papa es susceptible a muchas enfermedades, algunas extendidas mundialmente y otras confinadas a áreas más limitadas. Los agentes fitopatogénicos incluyen bacterias, hongos, virus y nemátodos. Las enfermedades provocadas por estos patógenos provocan las mayores pérdidas de producción, razón por la cual la búsqueda de resistencia genética es de alta prioridad para los mejoradores de todo el mundo.

Las infecciones virales producen pérdidas económicas significativas en tres formas: a) directas, a través de una disminución del rendimiento, con cifras que pueden llegar hasta el 50% en algunos años; b) indirectas, a través de un incremento en los costos debido a la producción de papa-semilla libre de virus (esto corresponde a un 20-25% del costo de producción en Argentina, por ejemplo); c) por imposibilidad de obtener productos con fines de exportación, debido a las limitaciones internacionales impuestas a la comercialización de materiales fuera de las tolerancias fitosanitarias y de la calidad permitidas. Los altos costos de producción se deben a que las papas se multiplican clonalmente sembrando tubérculos o trozos de tubérculo. Este método de propagación favorece la transmisión y diseminación de los patógenos almacenados. El control se basa en la siembra de material sano (fiscalizado y certificado) y en evitar la introducción de virus de fuentes externas (Vigliola, 1986). Las plantas se liberan de virus a partir del cultivo *in vitro* de ápices meristemáticos sometidos a termo y quimioterapia. La propagación del material sano se realiza en zonas con bajos niveles de inóculo viral, lo que determina la producción de distintas categorías de semilla dependiendo del porcentaje de contaminación y del número de ciclos de multiplicación (Hammond, 1990). Por otra parte, para aquellos virus que se transmiten por insectos o nematodos, el uso de pesticidas incide notablemente en los altos costos de producción.

Los virus más importantes son: el virus del enrollamiento de la hoja (PLRV, *Potato Leafroll Virus*) y el del mosaico rugoso (PVY, *Potato Virus Y*), por sus fuertes síntomas y el del mosaico latente (PVX, *Potato Virus X*), por su amplia dispersión debido a que se transmite por heridas y uso de herramientas contaminadas (Hooker, 1981 y 1986; Salazar y Accatino, 1990; Mendoza y col., 1990; Solomon-Blackburn y Barker, 2001b).

Hace cierto tiempo, se pensaba que el PVX no dañaba los cultivares debido a que es relativamente asintomático. Sin embargo, observaciones más cuidadosas demostraron que puede producir mermas de rendimiento del 10 al 25%. (Hooker, 1981; Salazar y Accatino, 1990; Solomon-Blackburn y Barker, 2001b). Cuando PVX y PVY infectan conjuntamente ciertas variedades de papa, actúan sinérgicamente y pueden producir pérdidas de hasta un 70% en los rendimientos (Solomon-Blackburn y Barker, 2001b).

El PVX es el miembro tipo del género *Potexvirus* (Verchot-Lubicz y col, 2007), uno de los 8 géneros que pertenecen a la familia *Flexiviridae* (Adams y col., 2004). Los miembros de esta familia se caracterizan por ser viriones flexibles y filamentosos, de entre 470 y 580 nm de largo, formados por subunidades de una única proteína de cápside (CP: *coat protein*). Los Potexvirus tienen un genoma monopartito de ARN de cadena positiva que codifica

para 5 marcos abiertos de lectura (ORFs: *open reading frames*). El genoma de PVX tiene una longitud de 6435 nt. El extremo 5' posee un *cap* de metilguanosa y en el 3' posee una cola de poli-A (Huang y col., 2004; Huisman y col., 1988). El primer ORF codifica para la replicasa viral. La región central del genoma codifica para tres ORFs superpuestos, conocido como bloque de tres genes (TGB: *triple-gene block*), codificando proteínas necesarias para el movimiento célula-célula; incluyendo una proteína supresora del silenciamiento (Verchot-Lubicz, 2005). El ORF final corresponde a la CP viral, la cual se requiere para el ensamblado del virión y el movimiento célula-célula (Huisman y col., 1988; Santa Cruz y col., 1998).

Asimismo, es importante destacar que el PVX es un virus modelo para estudios en fitopatología y como vector para distintas aplicaciones tecnológicas (Chapman y col. 1992; Batten y col., 2003).

Ante las pérdidas producidas por infecciones virales, los beneficios potenciales de contar con fuentes de resistencia son enormes, y disponer de cultivares resistentes es la manera económica y ambientalmente más aceptable para controlar las enfermedades virales en papa.

Sin embargo, en el caso de este cultivo el mejoramiento tradicional es lento y laborioso, limitado a la variación natural (por ejemplo, un programa típico de mejoramiento puede demandar unos 14 años hasta conseguirse una nueva variedad) y tampoco se dispone de genes de resistencia adecuados para la mayoría de los patógenos que la afectan en el germoplasma “comercial”. En este marco, el uso de técnicas de biología molecular para identificar y caracterizar genes de interés a partir de otras especies relacionadas presentes en el germoplasma silvestre brinda una oportunidad para superar estos problemas (Solomon-Blackburn y Barker, 2001b).

3.2.2. La interacción planta-patógeno

Sólo una pequeña proporción de las infecciones producidas por patógenos produce enfermedades y esto se debe principalmente a varias razones: a) la especie vegetal atacada por el patógeno no presenta los requerimientos que éste necesita y la planta se considera no-hospedadora (resistencia a nivel de especie o “*non-host resistance*”); b) a la presencia de barreras preformadas, estructuras o componentes tóxicos que presenta la planta y que impiden la entrada del patógeno; c) los mecanismos de defensa son activados tras el reconocimiento planta-patógeno. En todos estos casos decimos que la interacción es

incompatible (resistencia) pero sólo en el tercer caso el mecanismo de defensa depende exclusivamente de respuestas inducidas para limitar el ataque del patógeno. La enfermedad (interacción compatible) ocurrirá sólo cuando las defensas preformadas de la planta sean inadecuadas, las condiciones ambientales sean favorables para el patógeno y/o si las repuestas activas de defensa no sean efectivas.

Así, las plantas han desarrollado mecanismos pasivos y activos de defensa. Las respuestas activas de defensa pueden ser subdivididas en inmunidad adaptativa e innata. La inmunidad adaptativa en plantas parece estar restringida a las respuestas de defensa antivirales que dependen de mecanismos de silenciamiento mediado por ARN (Voinnet, 2005). El sistema inmune innato es más general y responde a una variedad amplia de patógenos de plantas. La inmunidad innata se basa en receptores especiales que pueden ser clasificados groseramente en dos grupos: Receptores de Reconocimiento de Perfiles o Patógenos (PRRs: *Pathogen or Pattern Recognition Receptors*) y las proteínas de Resistencia (R: *Resistance*). Los PRRs reconocen Perfiles Moleculares Asociados a Patógenos o Microbios (MAMPs/PAMPs: *Microbe- or Pathogen-Associated Molecular Patterns*) que generalmente corresponden a moléculas altamente conservadas compartidas entre microorganismos de la misma clase (Nürnberger y col., 2004; Zipfel y Felix, 2005; Bent y Mackey, 2007). Los PRRs permiten que las plantas reconozcan distintos microorganismos invasores usando un grupo limitado de receptores (Zipfel y Felix, 2005; Chisholm y col., 2006). Contrariamente a los PRRs, las proteínas R responden a moléculas (llamadas proteínas avirulentas o *elicitors*) que generalmente no están conservadas entre especies ni aún entre aislamientos de un determinado patógeno. De acuerdo con esto, las proteínas R están codificadas por grandes familias de genes, encontrándose varios cientos de genes por genoma (Meyers y col., 2003). Debido a esta relación uno-a-uno entre el gen *R* de la planta y el correspondiente gen de avirulencia (*Avr*) en el patógeno, a este tipo de inmunidad se la llamó resistencia gen-a-gen (Flor, 1971). La definición genética de esta interacción se explica mediante la hipótesis de Flor obtenida tras su trabajo realizado sobre la interacción entre el lino cultivado (*Linum usitatissimum*) y el hongo biotrófico *Melampsora lini* (Flor, 1947). Una pérdida o alteración de algunos de los dos genes (*R* o *Avr*) inducirá la enfermedad. Si bien el modelo fue desarrollado en una interacción planta-hongo, también proporciona la base genética para la mayoría de las resistencias activas en plantas contra patógenos tan diversos como bacterias, hongos, virus, nemátodos e insectos (Keen, 1990; Van der Biezen y Jones, 1999; Dangl y Jones, 2001; Chisholm y col., 2004). La interacción entre el PVX y los genes de resistencia en papa sigue este modelo.

3.2.3. Tipos de resistencia a virus en papa y nomenclatura

En las plantas de papa resistentes a virus se pueden encontrar dos tipos de respuesta diferentes mediadas por genes *R*: la resistencia extrema (ER: *extreme resistance*) y la resistencia hipersensible (HR: *hypersensitive resistance*).

Las plantas con resistencia extrema son aquellas que, cuando son inoculadas con virus, muestran ausencia de síntomas o una necrosis sumamente limitada (por ejemplo, lesiones puntuales). La infección viral es ínfima, si es que ocurre. Únicamente con técnicas de alta sensibilidad, se pueden detectar cantidades extremadamente bajas del virus, si las hay, tanto en hojas inoculadas como sistémicas. En general, este tipo de resistencia suprime la acumulación de virus, previniendo su multiplicación en estadios tempranos de la infección y no está normalmente asociada a muerte celular (Hämäläinen y col., 1997; Gilbert y col., 1998). La ER puede ser global, confiriendo resistencia contra varias cepas de un determinado virus (Solomon-Blackburn y Barker, 2001a).

Las plantas con resistencia hipersensible (HR) muestran lesiones necróticas locales, que son consecuencia de una respuesta de defensa rápida que resulta en la muerte de unas pocas células (necrosis) en el sitio de la infección previniendo la distribución del virus al resto de la planta (Dixon y col. 1994; Heath, 2000). El virus puede ser detectado casi siempre en las hojas afectadas. La HR es, frecuentemente, cepa (genotipo) específica. De hecho, la definición de razas en fitopatología se realiza bajo este criterio, como se verá más adelante. La HR también, puede ser afectada por condiciones ambientales o por la fisiología de la planta hospedadora (por ejemplo, madurez) (Solomon-Blackburn y Barker, 2001a).

Las respuestas de tipo ER y HR se describieron para PVX mediante estudios de inoculación por savia y por injerto (De Bokx, 1972; Cockerham, 1970).

Si bien están descritos otros tipos de resistencia (Solomon-Blackburn y Barker, 2001b), éstas no corresponden a la conferida por genes mayores de resistencia (Witham y col., 2006).

En este trabajo, se sigue la nomenclatura propuesta por Valkonen y col. (1996) para los genes mayores de resistencia. La primera letra, mayúscula para denotar un gen de resistencia dominante, indica el tipo de resistencia (usualmente *N* para HR y *R* para resistencia extrema u otra resistencia). La segunda letra, minúscula, indica el virus o la cepa contra la cual se confiere la resistencia, y luego se indica con minúscula y en subíndice la especie en la cual la resistencia fue encontrada u originada.

3.2.4. Los genes de resistencia *Nx*, *Nb* y *Rx*

Se han identificado numerosos genes de resistencia a PVX en el germoplasma de *Solanum* (Ross, 1986), pero los más utilizados en los planes de mejoramiento fueron el *Nx*, el *Nb* y los *Rx*. De éstos, los genes *Rx* son los más importantes por el grado de resistencia ("inmunidad") conferido contra las distintas cepas de PVX.

La existencia de inmunidad al PVX (gen de resistencia extrema) fue publicada por primera vez en el genotipo de papa USDA41956 (Schultz y Raleigh, 1933; Schultz y col., 1937); este genotipo sería el producto de varios cruzamientos incluyendo especies silvestres, recibiendo el gen de inmunidad del clon CPC1673 de *S. andigena* (Ross y Baerecke, 1950). Este gen fue posteriormente mapeado en *S. tuberosum*, localizándose en la región distal del cromosoma XII, denominándolo *Rx1* (Ritter y col., 1991).

Por otro lado, Cockerham (1970) describe una "segunda" fuente de resistencia extrema en *S. tuberosum* spp. *andigena* denominando al gen *Rxadg*.

A partir de *S. tuberosum* spp. *tuberosum* cv. Cara, en forma paralela, se mapea un "tercer" gen de resistencia extrema a PVX en cromosoma XII, denominado *Rx*, probablemente en la misma posición o en la vecindad del *locus Rx1* mapeado previamente (Bendahmane y col., 1999). El gen *Rx* en el cultivar Cara se encuentra estrechamente ligado al gen *Gpa2* de resistencia al nematodo *Globodera pallida* (Roupe van der Voort y col., 1999) en un segmento introgresado a partir de la entrada resistente CPC1673, postulándose que *Rx* y *Rxadg* corresponderían al mismo gen (Solomon-Blackburn y Barker, 2001a). La fuente de *Rx1* también posee en su *pedigree* a esta entrada, sugiriendo que *Rx*, *Rx1* y *Rxadg* corresponderían todos al mismo gen (eventualmente con variantes alélicas).

Ross y Baerecke (1950) hallaron resistencia extrema al PVX en genotipos de *S. acaule*, denominando al gen responsable *Rx_{acl}*. Cockerham (1970) describe otro gen de resistencia extrema al que denomina *Xⁱ* a partir de *S. acaule* y, finalmente, Ritter y col. (1991) mapean en papa el gen *Rx2* en una región intermedia del cromosoma V, postulando que este gen deriva de *S. acaule* debido a que en el *pedigree* del parental resistente está incluido el clon MPI 44.1016/10. Así se sugiere que *Rx_{acl}* y *Rx2* corresponderían al mismo gen (Solomon-Blackburn y Barker, 2001a).

Se postula que *Rx_{acl}* y *Xⁱ* podrían ser los mismos genes dado que ambos tienen en sus *pedigrees* el clon resistente MPI 44.1016/10 de *S. acaule* (Solomon-Blackburn y Barker, 2001a). Pero, De Jong y col. (1997) sugieren que *Xⁱ* podría ser *Rx1* o un tercer gen

(diferente a *Rx1* y *Rx2*). Con lo cual, *Rx_{acl}* y *Rx2* (pero no *X'*) corresponderían al mismo gen (Solomon-Blackburn y Barker, 2001a).

Entre los genes de resistencia hipersensible, se encuentran mapeados el gen *Nb_{ibr}* (de *S. tuberosum* spp. *tuberosum* cv. Pentland Ivory) en una posición intermedia de cromosoma V (De Jong y col., 1997) y el gen *Nx_{phu}* (de *S. phureja*) en el brazo largo del cromosoma IX (Tommiska y col., 1998).

Se observa que *Rx2* y *Nb_{ibr}* mapean en la misma región del cromosoma V estando estrechamente ligados y sin descartar la posibilidad de que ambos genes fueran alelos (De Jong y col., 1997). Marano y col. (2002) mediante mapeo genético de alta resolución del gen *Nb_{ibr}* (denominado *Nb*) y ensayos biológicos determinan que el gen *Nb* también está presente en el cultivar Cara donde se encuentra el gen *Rx1* y observan que la resistencia hipersensible conferida por el gen *Nb* está enmascarada por la respuesta de resistencia extrema dada por el gen *Rx*.

En la literatura se describen relaciones alélicas entre otros genes de resistencia a PVX no mapeados (Solomon-Blackburn y Barker, 2001a).

Hasta el presente, los genes de resistencia principalmente utilizados en el mejoramiento (*Nx*, *Nb*, y *Rx*) parecen ser una alternativa aceptable para el control del PVX a campo (Ross, 1986, Adams y col., 1984). Sin embargo, cabe aclarar que esta evaluación de los genes de resistencia depende de la dispersión de las cepas hipervirulentas HB y MS (ver a continuación) que son capaces de superar la resistencia conferida por cualquiera de estos genes conocidos. Así, ninguno de estos genes ofrece resistencia contra todas las cepas de PVX.

3.2.5. Interacción entre las cepas de PVX y los genes de resistencia

El PVX, como todos los virus RNA, presenta una gran variabilidad genética; la cual se refleja en el alto número de cepas o aislamientos o genotipos que han sido identificados en todo el mundo en base a los síntomas desarrollados en hospedantes indicadores (Salaman, 1938; Matthews, 1949). En este caso, se considera cepa (aislamiento que define un genotipo con comportamiento diferencial) para definir a las variantes del virus. Para otros fitopatógenos se hablaría de raza o patotipo pero estos términos han sido: o poco usados con PVX (raza) o se han usado con una acepción más restrictiva (patotipo). Estas cepas de PVX fueron clasificadas por Cockerham (1955) en cuatro grupos según su interacción con los genes de hipersensibilidad *Nx* y *Nb*, provenientes de *Solanum* (**Tabla 1**). Las cepas del

grupo I sólo infectan plantas que no contengan ninguno de los genes de resistencia hipersensible antes mencionados. Las del grupo II multiplican en genotipos portadores del gen *Nx* pero no lo hacen en genotipos portadores del gen *Nb*; contrariamente, las cepas del grupo III infectan genotipos *Nb* pero no infectan genotipos *Nx*. Las cepas del grupo IV infectan tanto genotipos *Nb*, *Nx* o *Nb:Nx*. Ninguna de las cepas típicas de los grupos de virulencia de Cockerham superan a los genes de resistencia extrema *Rx* (*Rx_{acl}* o *Rx_{adg}*, Ross, 1986; Fernández-Northcote, 1990).

Hasta el presente, sólo dos cepas de PVX fueron identificadas con capacidad para superar a los genes de resistencia *Rx*. Estas cepas son el PVX HB (Moreira y col., 1980) y el PVX MS (Tozzini y col., 1994; Tozzini, 1994 y 1997).

Fernandez-Northcote (1990) propuso una nueva clasificación para las cepas de PVX utilizando, como criterio de clasificación, la capacidad del virus para infectar tejidos portadores de los genes de resistencia *Rx*. En esta clasificación las cepas se dividen en patotipos. Pertenecen al patotipo 1 las cepas que no superan la resistencia conferida por el gen *Rx* mientras que pertenecen al patotipo HB las cepas que sí la superan (**Tabla 1**).

Tabla 1. Clasificación de las cepas de PVX de acuerdo con su compatibilidad con los genes *Nx*, *Nb* y *Rx*. (+) interacción compatible/susceptibilidad; (-) interacción incompatible/resistencia. (1) Cockerham (1955) (2) Fernandez-Northcote (1990).

Genes de reacción del hospedante						
Grupo (1)	hipersensibilidad				inmunidad <i>Rx</i>	Patotipo (2)
	<i>nx nb</i>	<i>Nx</i>	<i>Nb</i>	<i>NxNb</i>		
I	+	-	-	-	-	1
II	+	+	-	-	-	
III	+	-	+	-	-	
IV	+	+	+	+	-	
	+	+	+	+	+	HB

De las cepas virulentas aisladas, las más importantes son las cepas HB y MS, ya que éstas tienen la capacidad de superar, no sólo la resistencia mediada por los genes *Nx* y *Nb*, sino también la mediada por los genes de resistencia extrema *Rx*.

La cepa HB alcanza altas concentraciones en las plantas infectadas (Moreira y col., 1980) y, contrariamente a lo que se sugiere para las cepas que superan varios genes de resistencia (Jones, 1981), el PVX HB no muestra disminución de su capacidad competitiva (Jones, 1985). Sin embargo, su distribución geográfica parece estar limitada al altiplano peruano-boliviano, donde es común (Moreira y col., 1980). El PVX HB no ha sido detectado aún en Estados Unidos o Europa ni ninguna otra cepa que supere a los genes *Rx*.

La cepa MS fue aislada más recientemente (fines de los años 80) por el Ing. Agr. Julio Muñoz (Fac. de Ciencias Agrarias, Univ. Nac. de Córdoba). Esta cepa alcanza en plantas de tabaco y papa títulos 10 veces mayores que la cepa HB (Tozzini, 1997), aunque su capacidad para competir en mezclas con otras cepas de PVX no fue evaluada.

Se conoce muy poco respecto de su distribución. Aparentemente, fue detectada en las provincias de Mendoza y Córdoba. No existen estudios epidemiológicos del PVX MS en las áreas de cultivo en el país.

Desde el punto de vista filogenético, mediante el análisis de la secuencia genómica, el HB pertenece al grupo de aislamientos de origen americano (Querci y col., 1993) mientras que la cepa MS presenta elevada similitud con cepas de origen europeo (Tozzini, 1997). Así HB y MS pertenecen al mismo patotipo pero la similitud a nivel genómico es baja.

Las cepas HB y MS tienen una dispersión limitada o desconocida, pero dado que no se ha establecido aún la razón de esto, no se puede descartar que su dispersión aumente con el tiempo (Jones, 1981; Salazar, 2005). De acuerdo con la elevada similitud filogenética del MS con cepas europeas, no se puede descartar la proveniencia y/o aparición de esta cepa hipervirulenta en ese continente (Malcuit y col., 2000).

Moreira y col. (1980) no hallaron genes de resistencia a la infección por PVX HB entre especies silvestres de *Solanum*. Posteriormente, se identificó un genotipo de *S. sucrense* que presentaba resistencia, del tipo hipersensible, a esta cepa (Brown, 1984). Sin embargo, este gen no confería resistencia a otras cepas de PVX. Si bien la resistencia de *S. sucrense* es monogénica y dominante, el hecho de que sea específica contra HB hace que en los planes de mejoramiento deba ser incorporada junto con otros genes de resistencia o a genotipos que ya presenten resistencia a las cepas comunes. Tampoco se conoce la capacidad de este gen para detener la infección por PVX MS.

De lo expuesto hasta ahora se desprende que los genes de resistencia al PVX actualmente en uso están en peligro de ser superados a campo por algunas cepas de PVX. Sumado a esto, se han reportado recientemente nuevas cepas de PVX aisladas en Japón, Rusia y Corea relacionadas filogenéticamente con cepas de origen europeo (Kajiwada y col., 2002; Ravin y col., 2008; Choi y col., 2008).

3.2.6. La resistencia a PVX MS presente en *S. commersonii*

Con el objeto de hallar nuevas fuentes de resistencia a PVX, Tozzini y col. (1991) analizaron distintas especies de *Solanum* que no habían sido estudiadas hasta el momento para esta característica. En 3 especies (*S. sparsipilum*, *S. oplocense* y *S. commersonii*), de las distintas analizadas, hallaron genotipos que resistían la infección por una cepa de PVX del grupo de virulencia II. Estos genotipos fueron posteriormente desafiados con las cepas hipervirulentas HB y MS. Sólo el genotipo *S. commersonii* PI 243503 resistió a la infección por estas cepas, tanto en la inoculación por abrasión como por injerto (Tozzini, 1994).

Las hojas inoculadas o sistémicas de *S. commersonii* no presentan síntomas por lo que esta resistencia no parece actuar mediante una respuesta de hipersensibilidad o necrosis. Los resultados obtenidos en protoplastos infectados confirmaron esta observación, siendo el mecanismo de resistencia efectivo a nivel de célula aislada y sin mediar una disminución de la viabilidad de los protoplastos. Estos resultados también mostraron que la respuesta de resistencia es inducida por la infección determinando una reducción en la concentración de PVX por célula a partir de las 15 a 20 hs post-infección. Hasta las 15 hs post-infección la tasa de acumulación es similar a la observada en los controles susceptibles. La cinética de la infección en protoplastos fue similar para todas las cepas virales ensayadas (Tozzini, 1994).

Este mecanismo de resistencia fue también identificado en otras introducciones de *S. commersonii* existentes en el banco de germoplasma de INTA Balcarce.

S. commersonii es una especie silvestre de papa, diplode ($2x=2n=24$). El área de distribución de esta especie se circunscribe al cono sur de Sudamérica: noroeste, este y noreste de Argentina (en particular, este y sureste de la Pcia. de Buenos Aires, toda la Mesopotamia y en la región del NOA), sur de Paraguay, sur de Brasil y norte y sur de Uruguay; concentrándose en la región rioplatense (Spooner y Clausen, 1993; Hijmans y Spooner, 2001; Hijmans y col., 2002).

Esta especie silvestre de papa es ampliamente estudiada debido a que posee varias características de interés. Entre ellas, la elevada tolerancia a frío y su buena capacidad de aclimatación (Nyman y Waara, 1997; Chen y col., 1999; Carputo y col., 2003; Bamberg y col., 2005). Para esta última característica, se están realizando ensayos transcriptómicos comparativos (de los Reyes, 2008). También, presenta resistencia a las bacterias *Erwinia carotovora* (Carputo y col., 1997a y 2002; Barone y col., 2001) y *Ralstonia solanacearum* (Laferriere y col., 1999) y al hongo *Phytophthora infestans* (Micheleto y col., 2000).

A nivel mejoramiento tradicional, se cuenta con varios estudios de formación de híbridos somáticos con *S. tuberosum* para la introgresión de estas características de interés en la papa cultivada (Cardi y col., 1999; Carputo y col., 1997b y 2000; Barone y col., 2002; Iovene y col., 2004; Jansky, 2006).

Por otra parte, es una especie con un alto contenido de glicoalcaloides como commersonina, demissina, tomatina, dihidrocommersonina y delta-5-demissina (Vazquez y col., 1997). Debido a esto, puede ser potencialmente peligrosa para la salud humana. Sin embargo, en ciertas regiones de nuestro país se la utiliza como planta medicinal (Toursarkissian, 1980) y es conocida como “batatilla purgante” en el NO de Corrientes (Martínez-Crovetto, 1981).

En este contexto, *S. commersonii* se definió como una nueva fuente de resistencia extrema al PVX, incluyendo a las cepas hipervirulentas HB y MS las cuales son capaces de superar los genes de resistencia conocidos y usualmente empleados en los programas de mejoramiento de papa (Solomon-Blackburn y Barker, 2001b).

En un estudio preliminar, se observó que esta resistencia sería conferida por un gen único y dominante al que se denominó Rx_{cmm} (Martínez, 1997). Asimismo, basados en los resultados de nuestro grupo, Parrilla y Cardi (1999) logran transferir esta característica a *S. tuberosum* mediante hibridación somática, por fusión de protoplastos de *S. commersonii* PI 243503 con protoplastos de un clon de papa dihaploide.

3.3. Los genes y las proteínas de resistencia en *Solanaceae*

3.3.1. Los genes *R* y la clasificación de las proteínas R codificadas por éstos

En los últimos años, más de 50 genes *R* fueron clonados a partir de diferentes especies de plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas (Martin y col., 2003), unos 27 de los cuales corresponden a solanáceas (van Ooijen, 2007). Aunque los genes *R* confieren resistencia

contra patógenos muy diferentes, las proteínas codificadas comparten un número limitado de elementos conservados. Esta similitud sugiere una elevada conservación de los mecanismos de transducción de señales existentes en las plantas para desencadenar las respuestas de defensa mediadas por genes *R*. Basados en estos dominios conservados, las proteínas *R* pueden ser clasificadas en 4 clases diferentes. La primera clase de genes es la más abundante y codifica para proteínas llamadas NBS-LRR (*nucleotide-binding site leucin-rich repeat*) (Dangl y Jones, 2001). Esta clase contiene un subdominio central de unión de nucleótidos (NB: *nucleotide-binding*) como parte de una entidad mayor llamada dominio NB-ARC, el cual está presente en el factor 1 activador de proteasa apoptótica humano (APAF-1: *apoptotic proteasa-activating factor 1*), en las proteínas *R* y en la proteína CED-4 de *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans Dead protein 4*) (van der Biezen y Jones, 1998).

El dominio NB-ARC o NBS (*Nucleotide Binding Site*) está presente en diversas proteínas con actividad de unión a ATP o GTP, como las ATPasas y las proteínas G, lo que sugiere una posible función en las proteínas *R* como lugares de unión a nucleótidos; sin embargo, no está claro como ocurren estas uniones (Dangl y Jones, 2001). El dominio NBS abarca diferentes secuencias: kinasa 1a (también conocida como P-loop que presenta la secuencia consenso GxxxxGKT/S), kinasa 2 y kinasa 3. La presencia del dominio NBS altamente conservado en muchos de los productos de los genes *R* sugiere que la función de unión a nucleótidos sería esencial para el funcionamiento de estas proteínas. Sin embargo, el papel de los dominios NBS en la activación de las defensas de las plantas no está claro todavía (Bent, 1996). De todos modos, a partir de la cristalización de los dominios NB-ARC de APAF-1 y CED-4 y de la descripción detallada de los motivos presentes en el mismo, se están definiendo posibles roles del dominio NB-ARC presente en las proteínas *R* (Albrecht y Takken, 2006).

Hacia el extremo C-terminal del dominio NB-ARC se encuentra un dominio LRR (*leucine-reach repeat*), el cual a veces se presenta seguido de una extensión de largo variable. El dominio LRR está constituido de un número variable de secuencias repetitivas ricas en leucinas y otros residuos hidrofóbicos posicionados de manera regular. Los dominios LRR de algunas proteínas están implicados en funciones de interacción entre proteínas, interacción proteínas-carbohidratos y en unión de péptidos-ligandos (Jones y Jones, 1996; Kajava, 1998), por esta razón se supone que los productos de los genes *R* estarían involucrados en la interacción directa con el desencadenante de la respuesta o *elicitor* (Avr) (Bendahmane y col. 2000; Ellis y Peter, 2000).

A partir de la disponibilidad de la estructura cristalizada de dominios LRR de proteínas evolutivamente relacionadas con las proteínas R, se están pudiendo explicar ciertas características del dominio LRR y su rol en la función de las proteínas R (McHale y col., 2006; Takken y col., 2006).

Dentro de los productos de los genes R con dominio NBS-LRR, se pueden distinguir dos subclases, en función de la naturaleza del extremo N-terminal: los que presentan un dominio TIR y los que no presentan dicho dominio (no-TIR). La subclase TIR-NBS-LRR (o TNL) presenta un dominio denominado TIR (*Toll/interleukin-1 Resistance*) que tiene una gran identidad con dominios citoplasmáticos de la proteína *Toll* de *Drosophila* y del receptor de Interleukina-1 (IL-1) de mamíferos (con una similitud en la secuencia de aminoácidos del 42 y 41% respectivamente) involucrados en señalización intracelular (Hammond-Kosack y Jones, 1997). Esto indica que el dominio TIR estaría implicado en vías de transducción de señales, por la similitud que presenta con los dominios citoplasmáticos de *Toll* e IL-1, además también podría estar implicado en el reconocimiento específico del patógeno.

Dado que algunos de las proteínas que no poseen el dominio TIR (no-TIR) en su extremo N-terminal presentan una estructura llamada CC (*coiled coil*) se definió la subclase CC-NBS-LRR (o CNL) para toda la subclase no-TIR. El dominio CC es una secuencia repetida de 7 residuos con aminoácidos hidrofóbicos intercalados. La estructura de este dominio consiste en dos o más hélices alfa que interaccionan para formar una estructura helicoidal y que podrían estar implicadas en interacciones proteína-proteína, incluso en la formación de dímeros o trímeros, aunque también podrían estar involucradas en la transducción de señales (Martin y col., 2003). Las proteínas CNL a su vez se subdividen en dos grupos de acuerdo con la presencia de un extremo N-terminal corto o uno extenso.

El análisis filogenético del dominio NB-ARC de las proteínas NBS-LRR revela un agrupamiento por separado de las proteínas CNL y TNL. Esto sugiere la coevolución de los dominios N-terminal y NB-ARC y es indicativo de una segregación ancestral de estas dos clases, apoyando la subdivisión de las proteínas NBS-LRR en las dos subclases CNL y TNL (McHale y col., 2006). Todas las proteínas NBS-LRR se cree que actuarían intracelularmente, monitoreando el estado de las proteínas que son blanco de los efectores virulentos de los patógenos.

Un número limitado de las proteínas R actúan extracelularmente, y contienen un dominio LRR extracelular (eLRR: *extracellular LRR*) en el extremo N-terminal. Este eLRR está conectado mediante un dominio transmembrana a una región C-terminal citoplasmática

variable. Cuando el dominio citoplasmático contiene un dominio proteína-kinasa, la proteína R se clasifica en la clase RLK, correspondiente a Kinasas Similares a Receptores (*Receptor-Like Kinases*). Si no presentan este dominio, se clasifica en la clase RLP correspondiente a las Proteínas Similares a Receptores (*Receptor-Like Proteins*).

De esta forma, las cuatro clases en las que se clasifican las proteínas R son: TNL, CNL (ambas pertenecientes al grupo NBS-LRR), RLP y RLK (ambas pertenecientes al grupo eLRR).

La mayoría de las proteínas R de solanáceas pertenecen a la clase CNL, sólo se encuentran tres proteínas dentro de la clase TNL y 6 proteínas R corresponden a la clase RLP. Hasta el momento, ninguna proteína R perteneciente a la clase RLK se ha identificado en la familia *Solanaceae* (van Ooijen, 2007). Uno de los productos de los genes *R* clonados de solanáceas, no se clasifica en ninguna de las 4 clases (la proteína *Asc1* que confiere resistencia a *Alternaria alternata* en *S. lycopersicum*) debido a que no sería un proteína R típica (no involucra una interacción gen-a-gen) ya que la resistencia está dada por una sensibilidad reducida de las plantas que poseen esta proteína a una toxina del hongo (Brondwagt y col., 2000).

Entre los genes de resistencia a virus clonados hasta el presente en solanáceas (van Ooijen, 2007) se encuentran: el gen *N* de resistencia al TMV (*Tobacco Mosaic Virus*, Virus del mosaico del tabaco) de *N. tabacum*, perteneciendo la proteína *N* a la clase TNL (Whitham y col., 1994); luego, formando parte de la clase CNL encontramos los productos de los genes *Rx1* y *Rx2* de resistencia a PVX de *S. tuberosum* y *S. acaule*, respectivamente (Bendahmane y col., 1999; Bendahmane y col., 2000), el producto del gen *Sw-5^c* de resistencia al TSWV (*Tomato Spotted Wilt Virus*, Virus de la mancha negra del tomate) de *S. lycopersicum* (Brommonschenkel y col., 2000) y los productos de los genes *Tm-2* y *Tm-2-2* de resistencia al ToMV (*Tomato Mosaic Virus*, Virus del mosaico del tomate) de *S. lycopersicum* (Lanfermeijer y col., 2003 y 2005).

3.3.2. Factores de avirulencia de genes *R*

La definición bioquímica del sistema *gen a gen* implica la existencia de una molécula desencadenante (*elicitor*) producida por el gen *Avr* del patógeno y su correspondiente receptor producido por el gen *R* de la planta hospedadora. Se han clonado un elevado número de genes *Avr* de diferentes patógenos (principalmente de bacterias), identificándose una gran variedad en cuanto a secuencias; sugiriendo que los factores de

avirulencia podrían haber evolucionado a partir de factores de virulencia que luego se convirtieron en proteínas reconocidas por los productos de los genes *R* de la planta (Bonas y Lahaye, 2002; Jones y Dangl, 2006).

En la familia *Solanaceae*, con respecto a los 27 genes *R* clonados, sólo 13 de ellos tienen su correspondiente gen *Avr* clonado (Ooijen y col., 2007). Hasta el momento, en el caso de los virus, se han identificado los determinantes *Avr* para 5 de los genes *R* clonados en esta familia. Así, la helicasa del TMV está implicada en la resistencia específica del gen *N* en tabaco (Whitham y col., 1994); en el caso de los genes *Rx1* y *Rx2* de papa, se identificó a la proteína de la cápside (CP) del PVX (Bendahmane y col., 1995 y 2000); para los genes *Tm-2* y *Tm-2-2* se identificó a la proteína de movimiento (MP: *Movement Protein*) del ToMV (Calder y Palukaitis, 1992).

Se conocen varios casos en los que sustituciones de algún aminoácido del producto del gen *Avr* provocan la pérdida de especificidad y confieren al virus la habilidad de superar la resistencia (Harrison, 2002). Para el caso de PVX, la adquisición de diferentes determinantes de virulencia/avirulencia se postula que ocurrió por evolución convergente y no por recombinación entre cepas (Malcuit y col., 2000). El determinante de avirulencia para el gen *Nx* es también la CP (Kavanagh y col., 1992) mientras que para el gen *Nb*, es la proteína de movimiento de 25 kDa (Malcuit y col., 1999).

En el PVX MS, no están presentes los determinantes de virulencia de la proteína de cápside descritos para otras cepas de este virus, existiendo otros determinantes posibles y exclusivos de esta cepa (en comparación con las cepas cp, HB, S y X3) (Tozzini, 1997).

3.3.3. Respuesta mediada por la interacción R-Avr: Rx de papa y CP de PVX como sistema modelo

La CP es el *elicitor* de la resistencia mediada por *Rx* en papa. El clonado de los genes *Rx1* y *Rx2* (Bendahmane y col., 1999 y 2000) permitió comenzar a estudiar en detalle los mecanismos implicados en la interacción entre las proteínas involucradas en la respuesta de resistencia. Así, los estudios sobre la CP de PVX y el *Rx* tienen un rol central para definir cómo el *elicitor* desencadena las señales que conducirán a la resistencia contra la enfermedad. Como se mencionó, *Rx* es una proteína CC-NBS-LRR que previene la acumulación del virus en las hojas inoculadas y en protoplastos. Mutaciones en el dominio LRR de la proteína *Rx* permitieron conferir resistencia contra distintas cepas de PVX (Farnham y Baulcombe, 2006).

Rx normalmente confiere resistencia extrema, pero cuando la CP de PVX se expresa a partir de un promotor fuerte como es el 35S del CaMV (*Cauliflower Mosaic Virus*, Virus del mosaico del coliflor) se observa una respuesta de resistencia de tipo hipersensible (HR) (Bendahmane y col., 1999 y 2000). Como el PVX es el blanco de la resistencia mediada por *Rx*, parece que *Rx* actúa rápidamente para bloquear la multiplicación del virus y la expresión de más CP, con lo cual, la sobreproducción de CP a partir del promotor 35S de CaMV se observa que conduce a HR (Bendahmane y col., 1999 y 2000). Mutaciones en la CP de PVX en una lisina en la posición 121 y en una arginina en la posición 127 perturban la resistencia mediada por *Rx* y reducen la infección viral en plantas que carecen del gen *Rx* (Bendahmane y col., 1995).

El análisis por separado de la contribución de los dominios CC, NBS y LRR de la proteína *Rx* en la unión a la CP y los eventos de señalización posteriores que conducen a la respuesta de resistencia, suministró nueva información para establecer cómo funciona la interacción *R-Avr* (Bendhamane y col., 2002). Brevemente, la proteína *Rx* tiene un estado relajado en su conformación que es alterado por la interacción con la CP de PVX (Moffet y col., 2002; Rairdan y Moffet, 2006; Rathjen y Moffet, 2003). La CP causa que la proteína *Rx* cambie su plegamiento, exponiendo los dominios NBS-LRR. Este cambio conformacional en la proteína activaría una cascada de transducción de señales intracelulares que conducirían a la respuesta de resistencia (Moffet y col., 2002; Rathjen y Moffet, 2003). Más detalles del modelo PVX-*Rx* y de otras interacciones en solanáceas y/u otras especies se describen en la literatura (Rathjen y Moffet, 2003; Ooijen y col., 2007).

3.3.4. Distribución y origen de los genes *R*

Además de los genes que fueron aislados y confirmada su función como genes *R*, numerosos homólogos a genes *R* se han identificado en los estudios de secuenciación y anotación de los genomas de *Arabidopsis* y arroz (TAGI 2000, Goff y col., 2002; Meyers y col., 2002).

La mayoría de los genes *R* clonados codifican para proteínas de tipo NBS-LRR y los estudios evolutivos se han enfocado principalmente al estudio de esta clase de genes. Así, en *Arabidopsis*, la clase TNL de proteínas de tipo NBS-LRR es la mayoritaria, mientras que esta clase está ausente en monocotiledóneas (Meyers y col., 1999, 2003 y 2005; Pan y col., 2000). Esta diferencia podría reflejar diferencias en la coevolución de la dupla hospedante/patógeno en mono y dicotiledóneas.

En solanáceas, la mayoría de las proteínas NBS-LRR pertenecen a la clase CNL, mientras que sólo tres TNLs han sido identificados: el gen *Bs4* de tomate, el gen *Gro1-4* de papa y el gen *N* de tabaco que confieren resistencia contra *Xanthomonas campestris*, *Globodera rostochiensis* y el virus TMV, respectivamente (Oijen y col., 2007).

El agrupamiento de los genes *R* en *loci* complejos (*clusters*) es bien conocido, y los estudios moleculares demuestran que este agrupamiento resulta comúnmente de duplicaciones en tándem de secuencias parálogas (Meyers y col., 2003 y 2005; Michelmore y Meyers, 1998; Richly y col., 2002; Zhu y col., 2002). Este agrupamiento en *clusters* es un fenómeno, observado en varios *loci* de genes *R* (Hulbert y col., 2001). La mayoría de los genes NBS-LRR codificados en los genomas de *Arabidopsis* y arroz se encuentran en numerosos *clusters*, y la expansión dentro de estos *clusters* se predice que es consecuencia de duplicaciones en tandem producto del entrecruzamiento desigual (Meyers y col., 2003; Zhou y col., 2004; Richly y col., 2002; Baumgarten y col., 2003). Los *clusters* de genes *R* estrechamente relacionados y co-localizados intercambian frecuentemente secuencias, pero no hay evidencia de intercambio de secuencias entre genes relacionados que están localizados en *clusters* separados (Meyers y col., 2003 y 2005; Baumgarten y col., 2003). El análisis del genoma de *Arabidopsis* indica que numerosas duplicaciones genómicas de pequeña escala de genes NBS-LRR de estos *clusters* se copiaron o translocaron hacia lugares distantes y probablemente al azar del genoma (duplicaciones ectópicas) (Meyers y col., 2003 y 2005; Baumgarten y col., 2003; Leister, 2004).

Las duplicaciones genómicas de segmentos causaron probablemente un aumento sustancial en el número de secuencias NBS-LRR en *Arabidopsis* (Meyers y col., 2003 y 2005; Baumgarten y col., 2003; Nobuta y col., 2005). Luego de sucesivos eventos de este tipo de duplicaciones, varios NBS-LRR duplicados podrían haberse perdido, posiblemente debido a la selección (Leister, 2005; Nobuta y col., 2005). En ciertos *loci*, las duplicaciones en tandem expandieron las familias génicas y las secuencias duplicadas divergieron mediante la acumulación de mutaciones, aumentando la complejidad de las secuencias de los genes *R* (Leister, 2004; Nobuta y col., 2005). Aunque los NBS-LRRs muestran tasas de duplicación y mutación similares a las de otras familias de genes (Meyers y col., 2003 y 2005), la selección natural podría haber influenciado diferencialmente en la composición de esta familia de genes contribuyendo a la diversidad de los genes *R*.

En solanáceas, los genes *R* se encuentran en *clusters* y se observa conservación en la posición y función de genes *R* entre distintos géneros de la familia (Grube y col., 2000; Pan y col., 2000). Se identificaron 12 *clusters* de genes *R* comunes entre los géneros de papa,

tomate y pimiento (Grube y col., 2000), encontrándose casos en los cuales los genes *R* específicos para el mismo patógeno se localizan en regiones genómicas similares en diferentes géneros de hospedadores (Ejemplo: genes *R* contra *Phytophthora* en *Solanum* y *Capsicum*). Contrariamente, genes *R* que confieren resistencia contra otros patógenos como *Globodera*, TMV, TSWV y PVY que fueron mapeados en dos o más géneros de solanáceas, no se localizaron en regiones correspondientes entre sí. Esto lleva a plantear dos hipótesis: que los alelos de *loci* ortólogos en diferentes géneros de plantas no son funcionales o no confieren típicamente resistencia contra el mismo patógeno o patógenos cercanamente relacionados; o, como alternativa, que los genes ortólogos normalmente confieren resistencia a patógenos relacionados (Grube y col., 2000).

Genes que confieren resistencia contra el mismo grupo de patógenos (virus, nematodos, hongos bacterias) se encontraron en posiciones correspondientes del genoma en 6 de los 12 *clusters* comunes entre papa, tomate y pimiento (Grube y col., 2000).

Teniendo en cuenta que cambios mínimos en la secuencia de los genes *R* pueden alterar la especificidad taxonómica, resultando en el reconocimiento de diferentes cepas o patotipos de patógenos; esto podría explicar la presencia de genes *R* contra diferentes patógenos localizados en regiones correspondientes del genoma de los diferentes géneros de esta familia (Grube y col., 2000).

Se ha observado el agrupamiento filogenético de homólogos a genes *R* en tomate y otros miembros de la familia *Solanaceae* pero no con homólogos a genes *R* de *Arabidopsis*, indicando una marcada y rápida evolución de homólogos a genes *R* durante la diversificación de las diferentes familias de plantas (Pan y col., 2000).

Considerando los mapas genéticos comparativos de tomate y papa se observan posiciones sinténicas conservadas de homólogos de genes *R* (Pan y col., 2000).

En papa se observan varias regiones genómicas donde se localizan la mayoría de los genes y QTLs de resistencia mapeados hasta el momento (*resistance hotspots*, puntos calientes donde se ubican genes *R*) (Gebhardt y Valkonen, 2001). Así, se encuentran regiones que contienen múltiples genes de resistencia y QTLs contra diferentes patógenos específicos de papa en los cromosomas III, IV, V, VII, IX, XI y XII. Por estudios comparativos con otras especies de solanáceas (tomate, tabaco y pimiento) se detectan regiones que revelan sintenia entre *loci* de resistencia entre estas especies (Gebhardt y Valkonen, 2001). Recientemente, varios genes de resistencia a diferentes patógenos se mapearon en el cromosoma IX, confirmando que esta es una región genómica de localización de genes *R*

en *Solanaceae* (Simko y col., 2004a y 2004b; Smilde y col. 2005; Marczewski y col., 2006; Sato y col., 2006; Sliwka y col., 2006; Szajo y col., 2008).

3.4. Herramientas para realizar estudios genómicos en plantas en general y en *Solanaceae* en particular

3.4.1. Los marcadores moleculares

Los marcadores moleculares detectan variación en la secuencia de ADN entre genotipos. La base molecular de todos los marcadores de ADN son las mutaciones de punto (polimorfismos de un nucleótido o SNP: *Single Nucleotide Polymorphism*), inserciones, deleciones o inversiones de fragmentos de ADN que diferencian los genomas individuales de todos los miembros de una especie. Estos polimorfismos del ADN sobrevivieron a la selección durante la evolución de las especies porque no tuvieron un efecto negativo sobre la supervivencia y reproducción. La herencia mendeliana, la neutralidad fenotípica y la disponibilidad ilimitada hacen de los marcadores de ADN importantes herramientas para el análisis genómico.

En papa estos marcadores fueron y son usados para la construcción de mapas de ligamiento (Bonierbale y col., 1988 y 1994; Gebhardt y col., 1991), mapeo de genes (Gebhard y col., 1993; Bryan y col., 2002), análisis de caracterización genómica (*fingerprinting*) (Görg y col., 1992; Melbourne y col., 1997; McGregor y col., 2000; Norero y col., 2004), estudios filogenéticos (Debener y col., Raker y Spooner, 2002) y caracterización de entradas de bancos de germoplasma (Marcucci Poltri, 1998; Gebhardt y col., 2004; Ghislain y col., 2004).

Desde 1980, cuando se emplearon por primera vez marcadores RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) para construir el primer mapa molecular del genoma humano (Botstein y col., 1980), se fueron desarrollando varios tipos de marcadores basados en ADN (Andersen y Lübberstedt, 2003; Gupta y Rustgi, 2004; Schlötterer, 2004; Hopp y Martínez, 2005).

En la actualidad, se tiende a clasificar a los marcadores moleculares en tres grandes categorías o clases: a) marcadores de ADN al azar (RDM: *random DNA markers*) los cuales son fenotípicamente neutros y derivados de cualquier región del genoma (de regiones transcritas y no transcritas); b) marcadores derivados de regiones transcritas del genoma tanto de clones de cDNA, secuencias expresadas (ESTs) o genes específicos

(GTMs: *gene targeted markers*) y c) marcadores funcionales (FMs: *functional markers*) los cuales están causalmente relacionados con la variación fenotípica observada relevante para el mejoramiento (Andersen y Lübberstedt, 2003; Gupta y Rustgi, 2004).

A continuación se describen sólo aquellos marcadores de ADN que se emplean o a los que se hace referencia en este trabajo. Éstos corresponden a la primera clase (RFLP, RAPD, AFLP, CAPS, SCAR, SSR) y segunda clase (RGAs, ESTs) de marcadores anteriormente definidas.

3.4.1.1. Polimorfismos en la longitud de fragmentos de restricción (RFLP)

Los RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphisms*) son los marcadores moleculares más conocidos y documentados. Los fragmentos de restricción de ADN genómico (obtenidos por cortes con enzimas de restricción y que varían en largo entre dos genotipos por diferencias en las secuencias nucleotídicas) son detectados por hibridación con sondas clonadas (genómicas o de ADNc, de aproximadamente 800 pb de largo) de secuencias homólogas usando la técnica de *Southern blotting* (Southern, 1975). También, pueden usarse sondas heterólogas de especies relacionadas (*Zooblotting*). Los polimorfismos entre las distintas muestras son resultado de mutaciones en la secuencia de los sitios de restricción (evitando así el corte de la enzima) o en la secuencia del ADN del fragmento (produciendo la creación de nuevos sitios de restricción), o la inserción o delección de bases (alterando el largo del fragmento entre los sitios) (Burr y col., 1983; Evola y col., 1986; Helentjaris y col., 1985) (**Figura 2**).

Los RFLP son altamente reproducibles dentro y entre laboratorios. Son marcadores codominantes siendo visibles las diferentes variantes alélicas de las bandas en el heterocigota, permitiendo la distinción de las tres clases genotípicas y aportando información genética completa de un *locus* simple.

La cantidad de ADN requerida para el análisis por RFLP es relativamente grande (5-10 μ g); pero un único *Southern blot* puede ser usado varias veces con distintas sondas, haciendo que esta técnica sea más eficiente. Se pueden hibridar simultáneamente con una sonda múltiples *Southern blots*, correspondientes a cientos de individuos, generándose así mapas saturados de marcadores. Es posible localizar fácilmente nuevos marcadores genéticos o genes dentro del contexto de un mapa de RFLP ya existente.

Sin embargo, es una técnica laboriosa que, en general, requiere el empleo de radiactivo, demanda tiempo y no es fácil de automatizar.

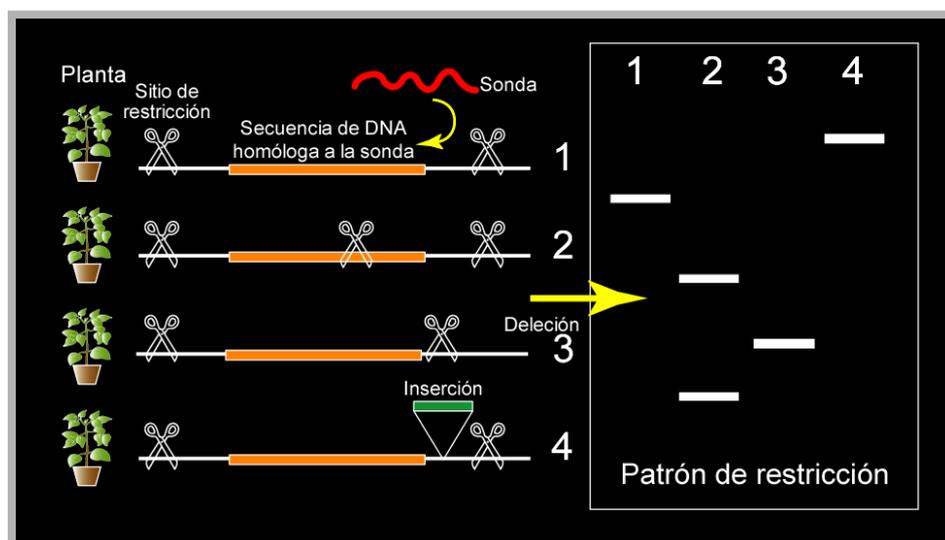


Figura 2. Perfiles RFLP observados de acuerdo a la presencia de diferentes mutaciones en el *locus* analizado (Hopp y Martínez, 2005).

Estos marcadores fueron usados para la construcción de los primeros mapas de ligamiento de papa (Bonierbale y col., 1988; Gebhardt y col., 1989).

Los marcadores RFLP, en particular, permitieron por primera vez el mapeo comparativo de genomas de especies sexualmente incompatibles (Bonierbale y col., 1988). Esto fue posible gracias a que el ADN de especies relacionadas puede compartir una elevada similitud a nivel de secuencia y el ensayo de RFLP está basado en la hibridación entre una sonda marcada de un marcador y la secuencia blanco unida a una membrana. Así, dependiendo de las condiciones experimentales empleadas, se detecta la hibridación cruzada entre secuencias de ADN que no son idénticas pero sí similares, y los marcadores de RFLP originados en una especie pueden ser usados para la construcción de mapas de ligamiento en especies relacionadas (Tanksley y col., 1992). El ligamiento conservado entre *loci* identificados por los mismos marcadores en diferentes especies indican no sólo la similitud entre las secuencias de ADN sino también similitud a nivel de la estructura del genoma (sintenia).

3.4.1.2. ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD)

La técnica de RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) es la versión comúnmente más usada de un grupo de técnicas desarrolladas simultáneamente, llamadas colectivamente MAAP (*Multiple Arbitrary Amplicon Profiling*) (Caetano-Annollés, 1994), las cuales involucran el uso de un iniciador de secuencia “arbitraria” en una reacción de

PCR, resultando en la amplificación de productos discretos de ADN. Cada producto deriva de una región del genoma que contiene dos segmentos cortos de secuencia complementaria a la del iniciador, ubicados en cadenas opuestas y suficientemente cerca (0,5 a 3 kb) para permitir la amplificación. Usando iniciadores cortos y bajas temperaturas de hibridación (*annealing*) se asegura que varios sitios distribuidos al azar en el genoma generen productos de amplificación (**Figura 3**).

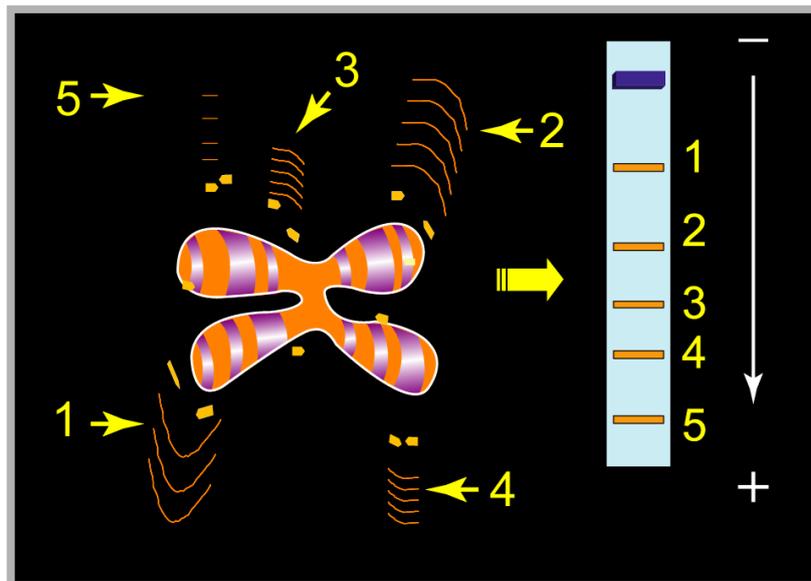


Figura 3. Generación de fragmentos mediante la amplificación por RAPD (Hopp y Martínez, 2005). Las flechas en bloque anaranjadas indican el iniciador de RAPD que hibrida al azar en distintos sitios del cromosoma permitiendo la amplificación de fragmentos (indicados en color naranja). A la derecha se representa el esquema resultante de una electroforesis en gel de los productos obtenidos (1-5) para el ejemplo.

En la técnica de RAPD los productos de amplificación se separan en geles de agarosa en presencia de bromuro de etidio y se visualizan mediante luz UV (Williams y col., 1990). Las técnicas de AP-PCR (*Arbitrary Primed PCR*) (Welsh y McClelland, 1990) y DAF (*DNA Amplification Fingerprinting*) (Caetano-Annollés y col., 1991; Caetano-Annollés, 1993) difieren de los RAPD principalmente en el largo del iniciador, en la exigencia de las condiciones de reacción y en el método de separación y detección de los fragmentos. En todos los casos, los polimorfismos se detectan como presencia o ausencia de bandas y son resultado principalmente de diferencias de secuencias en uno o ambos sitios de pegado del iniciador. Estas técnicas son muy atractivas ya que no requieren de sondas ni de secuencias conocidas para diseñar los iniciadores. Se destacan por su simplicidad y fácil implementación en un laboratorio, ya que demandan poco equipamiento.

El análisis por RAPD requiere poca cantidad de ADN (15-25 ng), es un ensayo no radiactivo, se realiza en pocas horas, pudiéndose analizar varias muestras. Sin embargo, es absolutamente crítico mantener estrictas condiciones de reacción para poder reproducir perfiles de amplificación consistentes (Caetano-Annollés, 1994)

En la práctica, las principales limitantes de estos marcadores son la baja reproducibilidad de la técnica y que son marcadores dominantes (los heterocigotas no se pueden distinguir de los homocigotas). Además, presentan la desventaja de la comigración bandas las cuales tienen similar tamaño, pero pueden no corresponder al mismo *locus* y/o alelo; dificultando el análisis en ciertos estudios poblacionales debido a los supuestos que se deben asumir.

3.4.1.3. Polimorfismos de longitud de fragmentos amplificados (AFLP)

La técnica para obtener los AFLPs (*Amplified Fragment Length Polymorphisms*) está basada en amplificación por PCR y es una alternativa para generar un gran número de bandas en un corto tiempo (Zabeau y Vos 1993; Vos y col., 1995). Combina la digestión con enzimas de restricción y la amplificación por PCR (**Figura 4**). El primer paso involucra la digestión del ADN con dos enzimas específicas, una de corte raro o infrecuente (comúnmente, *EcoRI*, *HindIII* o *PstI*) y otra de corte frecuente (comúnmente, *MseI*). Luego, se ligan adaptadores a los extremos de los fragmentos, aportando secuencias conocidas para la amplificación por PCR. Se emplean iniciadores que poseen la secuencia conocida del adaptador más 1, 2 o 3 bases adicionales (cada una correspondiente a una de las cuatro posibles: A, G, C o T). Así, la amplificación sólo puede darse en aquellos fragmentos donde los iniciadores son capaces de pegarse, ya que contienen la secuencia del adaptador más las bases complementarias a los nucleótidos adicionales agregados. De esta manera, las bases adicionales son nucleótidos selectivos. Si se usa un nucleótido selectivo, se amplificarán más fragmentos que si se usan dos, y se amplificarán aún menos fragmentos usando tres nucleótidos selectivos. Por razones de índole técnica, la adición de más de tres nucleótidos selectivos, resulta en amplificaciones no específicas. Comúnmente, se llevan a cabo dos reacciones separadas de PCR. En la primera reacción, se usan iniciadores con un nucleótido selectivo, mientras que en la segunda reacción, y usando como templado la primera, se emplean iniciadores con el mismo nucleótido selectivo anterior más uno o dos adicionales (**Figura 4**). En la práctica, esto resulta en la amplificación de entre 50-100 fragmentos, los cuales se separan mediante electroforesis en gel de poliacrilamida.

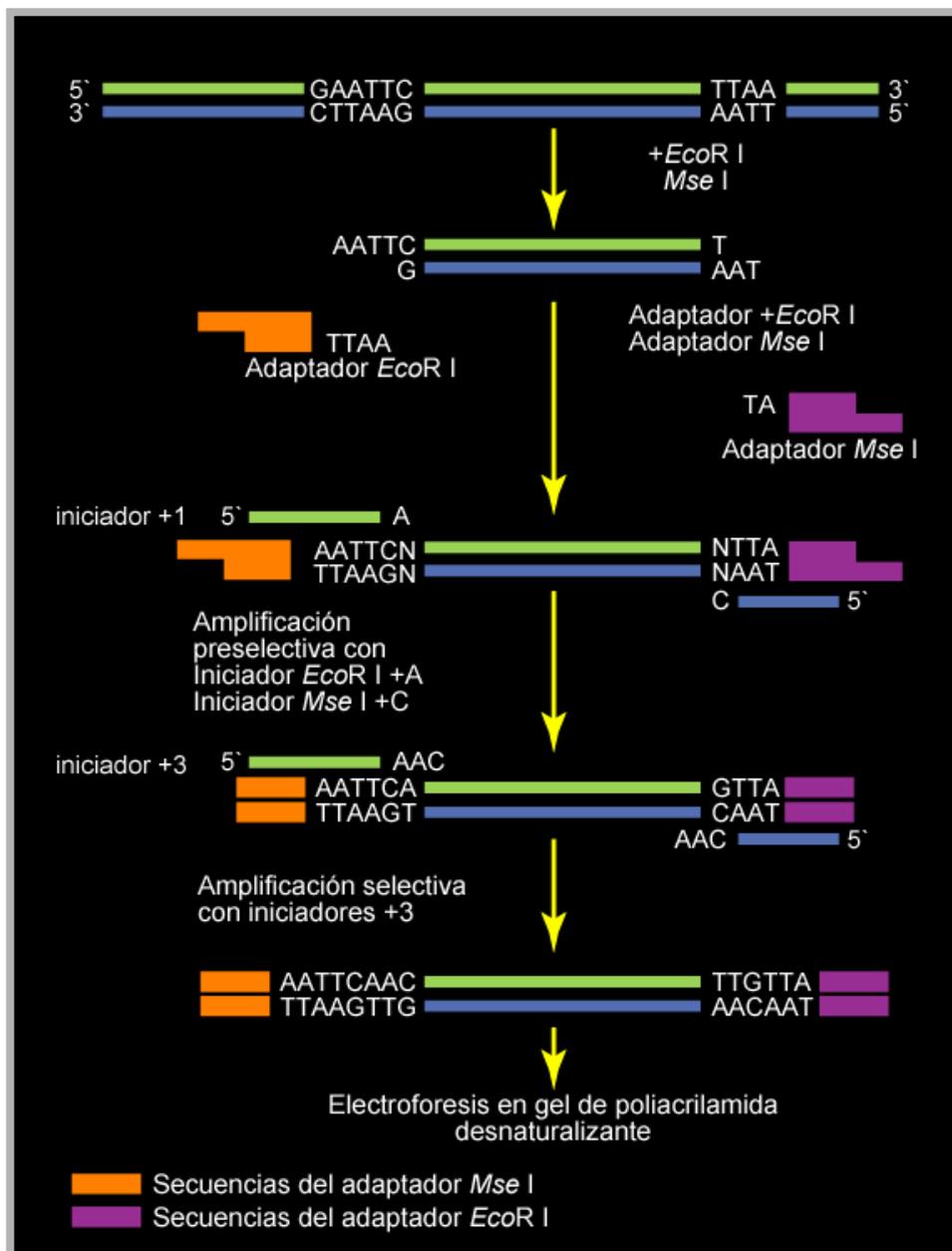


Figura 4. Etapas involucradas en la generación de fragmentos de AFLP (Hopp y Martínez, 2005).

Los productos amplificados se visualizan mediante autorradiografía cuando se emplean iniciadores marcados radiactivamente, o métodos no radiactivos que involucran iniciadores marcados con compuestos fluorescentes y empleo de equipos de detección específicos (secuenciadores automáticos u otros sistemas), o tinción con plata y observación directa empleando un transiluminador de luz blanca.

Los AFLP son una importante herramienta para detectar varios polimorfismos en un único ensayo siendo tan reproducibles como los RFLPs. Una ventaja adicional, es que es posible automatizar la detección de estos marcadores. Requieren más ADN (0,3 a 1,0 µg) y son

técnicamente menos simples que los RAPDs. Como estos últimos, son marcadores dominantes y presentan comigración de bandas que no necesariamente corresponden al mismo *locus*.

En los últimos años, debido a la reducción en los costos para el empleo de secuenciadores automáticos y otros avances técnicos para el análisis de datos, esta metodología ha recibido un nuevo impulso para su aplicación en distintos estudios genómicos (Meudt y Clarke, 2007; Bonin y col., 2007).

3.4.1.4. Métodos basados en PCR sitio específica: marcadores CAPS y SCAR

Estos marcadores se basan en amplificar regiones específicas del genoma, con lo cual se deben utilizar iniciadores de secuencia conocida. En general, estos marcadores derivan de marcadores de interés previos de tipo RFLP, AFLP y/o RAPD, generando un método más simple y sencillo para la detección de los mismos.

El método más simple para comparar fragmentos específicos amplificados es PCR-RFLP o CAPS (*Cleaved Amplified Polymorphic Sequence*, Secuencia Polimórfica Amplificada y Clivada). En este caso, el producto específico amplificado se digiere con una enzima de restricción y los fragmentos obtenidos se visualizan en gel de agarosa mediante tinción con bromuro de etidio (Akopyanz y col., 1992; Tragoonrung y col., 1992; Konieczny y Ausubel., 1993; Ghareyazie y col., 1995). Este tipo de análisis permite detectar polimorfismos en la región específica amplificada y es más informativo cuando los sitios de restricción están mapeados en el *locus*. Estos marcadores pueden derivar de marcadores tipo RFLP que luego fueron clonados y secuenciados para definir las condiciones del marcador CAPS (Livneh y col., 1992).

Los SCARs (*Sequence Characterized Amplified Regions*, Regiones Amplificadas de Secuencia Caracterizada) derivan en general, de marcadores RAPD individuales (como ejemplo ver Paran y Michelmore, 1993) pero también pueden derivar de marcadores de tipo AFLP (Cho y col., 1999; McLenachan y col., 2000; Brugmans y col., 2003; Nicod y Largiadèr, 2003; Shirasawa y col., 2004; Bussell y col., 2005). Las bandas de RAPD (o AFLP) de interés son clonadas, se determinan las secuencias nucleotídicas terminales y éstas son usadas para diseñar iniciadores para la amplificación específica del fragmento deseado (**Figura 5**).

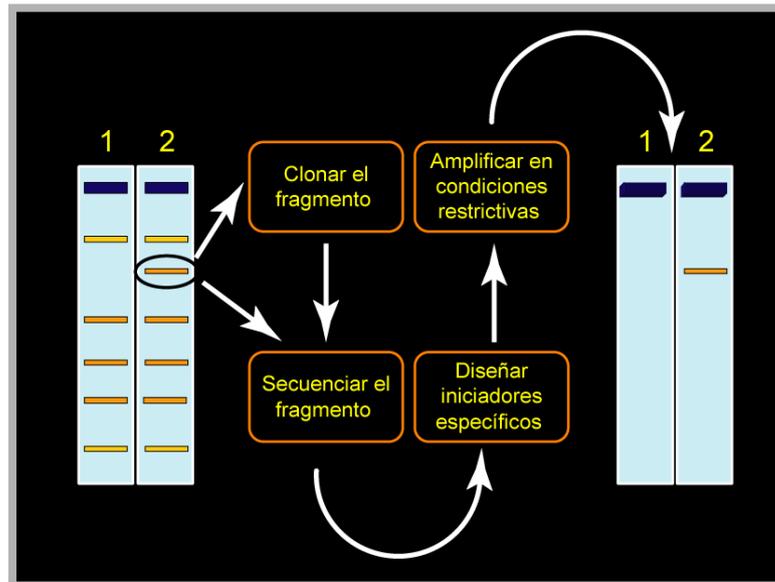


Figura 5. Pasos necesarios para la generación de un marcador SCAR a partir de un fragmento obtenido por RAPD (Hopp y Martínez, 2005). A la izquierda se esquematiza el gel del cual se aísla el fragmento de interés (por ejemplo, de un perfil de RAPD). A la derecha se representa el esquema resultante de la electroforesis en gel del SCAR obtenido sobre los mismos genotipos (calles 1 y 2).

Esta metodología aplicada a fragmentos de RAPD es muy ventajosa ya que permite realizar la amplificación por PCR en condiciones más rigurosas y reproducibles (Paran y Michelmore, 1993). En el caso de AFLPs, facilita notablemente el análisis de marcadores de interés (Weaver y col., 1994; Cho y col., 1996; Rouppe van der Voort y col., 1997a y 1997b; Brugmans y col., 2003).

Las ventajas de los métodos basados en PCR sitio-específica son la rapidez y simplicidad en la obtención de los datos y la información generada, como así también la reproducibilidad y la posibilidad de transferencia a otros laboratorios. Según las características de su diseño, pueden llegar a ser codominantes (Konieczny y Ausubel, 1993). Son ampliamente utilizados en los programas de mejoramiento asistido por marcadores (MAS) y en mapeo físico de genomas. La desventaja más importante es que la cobertura del genoma está muy restringida, limitada a una única secuencia.

3.4.1.5. Microsatélites o Repeticiones de Secuencias Simples (SSR)

Los microsatélites, conocidos también como SSR (*Single Sequence Repeats*) o STMS (*Sequence-tagged Microsatelites*), son *loci* altamente polimórficos presentes en varios sitios del genoma. Se basan en la existencia de regiones hipervariables distribuidas en el

genoma de los organismos superiores, las cuales están compuestas de secuencias de ADN repetidas en tándem, de 2-8 pb de largo (dinucleótidos, trinucleótidos, tetranucleótidos, etc).

Ya que las secuencias flanqueantes a cada SSR serían únicas, si se clona y secuencia un SSR, se pueden diseñar iniciadores adyacentes a esas regiones, definiendo al *locus* microsatélite (Beckman y Soller, 1990; Morgante y Olivieri, 1993). Así, las diferencias en el número de repeticiones en el *locus* analizado revelarán diferencias genéticas entre los individuos (**Figura 6**).

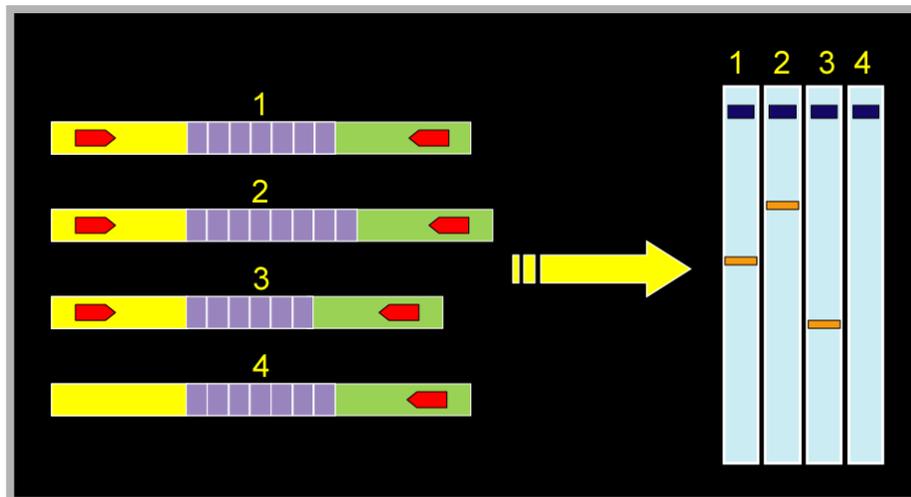


Figura 6. Origen del polimorfismo para los marcadores microsatélites (Hopp y Martínez, 2005). Con flechas rojas se indican los sitios de unión de los iniciadores sobre el *locus* del microsatélite. Con bloques violetas se indican las unidades repetidas del microsatélite. A la derecha se representa el esquema resultante de una electroforesis en gel de los alelos obtenidos (calles 1-4) para el *locus* microsatélite del ejemplo.

Estos marcadores tienen muchas ventajas. Son, generalmente, *loci* simples, y debido a la alta tasa de mutación, son frecuentemente multialélicos (Saghai-Marouf y col., 1994) (**Figura 6**). Son marcadores codominantes y se detectan mediante PCR.

Las diferencias entre los alelos se deben al deslizamiento de la ADN polimerasa que agrega y sustrae unidades repetidas y provoca mutaciones puntuales (Kruglyak y col., 1998).

Comúnmente se resuelven mediante electroforesis en geles de poliacrilamida (mediante el empleo de radiactivo o tinción con plata), donde se pueden distinguir cambios de una repetición y detectarse todos los posibles alelos. Una alternativa es analizarlos mediante el empleo de un secuenciador automático para la detección de los fragmentos marcados fluorescentemente. El ensayo es relativamente rápido y puede ser automatizado.

Los marcadores SSR son herramientas muy robustas, transferibles entre laboratorios y proveen mucha información (Morgante y Olivieri, 1993; Powell y col., 1996).

La mayor desventaja de los SSRs son los altos costos de desarrollo, asociados a la identificación de las secuencias de ADN flanqueantes y la generación y análisis de iniciadores confiables. Otra desventaja es que los SSR son específicos para cada especie por lo que está muy limitada su transferencia a nivel de género (Peakall y col. 1998; Westman y Kresovich, 1998).

Una alternativa que permite superar esta última limitación, son los marcadores ISSR (*Inter-Simple Sequence Repeats*) que derivan conceptualmente de los marcadores microsatélites. Los ISSRs se generan mediante amplificación por PCR empleando iniciadores que contienen en su secuencia repeticiones de di o trinucleótidos junto con 2 o 3 bases nucleotídicas determinadas en el extremo 3'. Esto permite la amplificación de *loci* que se encuentran entre las regiones repetidas (Ratnaparkhe y col., 1998). Al tener en el iniciador esas bases extras, a este tipo de marcador se lo conoce también como microsatélite anclado (AMP-PCR, *Anchored microsatellite-primed PCR*).

Los iniciadores de ISSR pueden ser empleados en diferentes especies ya que no están diseñados sobre una secuencia particular, amplificando regiones al azar entre *loci* microsatélites.

En papa, los microsatélites se desarrollaron a partir de secuencias de ADN de *S. tuberosum*. La primera generación de SSRs se obtuvo a partir de la identificación de motivos repetidos específicos en secuencias de genes (Veilleux y col., 1995; Kawchuk y col., 1996; Provan y col., 1996; Schneider y Douches, 1997). La segunda generación de SSRs proviene de genotecas enriquecidas de motivos repetidos (Melbourne y col., 1998). Recientemente, surge la tercera generación a partir del análisis de la presencia de motivos repetidos en secuencias expresadas (ESTs) lo que permitió el desarrollo de nuevos SSR en esta especie (Ghislain y col., 2004; Feingold y col., 2005).

3.4.1.6. Análogos a genes de resistencia (RGA)

Como se describió anteriormente, la identificación de numerosos genes *R* funcionales a partir de especies modelo y cultivadas reveló que la mayoría de estos genes codifican para proteínas citoplasmáticas con dominios de unión a nucleótidos (NBS) y de repeticiones ricas en leucinas (LRR), los cuales pertenecen a *loci* complejos de arreglos de genes relacionados (Martin y col., 2003). Basado en la secuencia de los genomas de *Arabidopsis*

y arroz, se estima que la mayoría de los genomas de plantas contienen cientos de genes NBS-LRR (TAGI 2000, Goff y col., 2002; Meyers y col., 2002).

La conservación de varios motivos estructurales dentro del dominio NBS codificado por los genes *R* de plantas permitió el desarrollo de aproximaciones basadas en homología dirigidas a la identificación de secuencias estructuralmente relacionadas, denominadas Análogos a Genes de Resistencia (*RGAs: Resistance Gene Analogs*) (Kanazin y col., 1996; Yu y col., 1996; Leister y col., 1996; Aarts y col., 1998; Shen y col., 1998; Pan y col., 2000; van der Linden y col., 2004).

Los RGAs se obtienen mediante amplificación por PCR empleando iniciadores degenerados diseñados sobre las secuencias conservadas presentes en los distintos genes *R* ya clonados, permitiendo el aislamiento de secuencias similares en otras especies de plantas. Estos marcadores se pueden resolver mediante electroforesis en geles de agarosa o poliacrilamida (Chen y col., 1998), pudiendo aislar y secuenciar los fragmentos obtenidos para su posterior caracterización.

Uno de los primeros trabajos de detección de RGA fue realizado en papa (Leister y col., 1996), mediante el diseño de oligonucleótidos sobre las secuencias de los motivos conservados entre los genes *R* de tabaco (*N*: gen de resistencia al virus TMV) y de *A. thaliana* (*RPS2*: gen de resistencia a la bacteria *Pseudomonas syringae*) realizando amplificaciones sobre ADN.

De esta forma, obtuvieron productos de amplificación que resultaron homólogos a genes de resistencia conocidos (RGAs) y que se mostraron ligados, sin recombinación, con el *locus Gro1* de resistencia al nematode *G. rostochiensis* y al *locus R7* de resistencia a *Phytophthora infestans* de papa. Las posiciones en el mapa de estos fragmentos de genes de papa obtenidos por PCR también se correlacionaron con *loci* de resistencia en los genomas relacionados de tomate y tabaco. Los autores indicaron que los genes de resistencia de plantas que son efectivos contra nematodos, hongos, bacterias y virus podrían ser aislados basándose en las secuencias de los motivos comunes usando la metodología de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Está ampliamente reportada la cosegregación de RGAs específicos con *loci R* y/o con *loci* de caracteres cuantitativos (QTL: *Quantitative Trait Loci*) involucrados en resistencia a enfermedades (Hunger y col., 2003; Kuhn y col., 2003), demostrando que los RGAs son una herramienta poderosa para el desarrollo de marcadores ligados a *loci* de resistencia.

En solanáceas, comparando la posición genética y la secuencia de fragmentos RGAs con secuencias y/o posiciones de mapa de genes *R* conocidos, se pueden localizar nuevos

clusters de genes *R* o marcadores estrechamente ligados con genes de resistencia de interés (Leister y col., 1996; Grube y col., 2000; Pan y col. 2000; Gebhardt y Valkonen, 2001).

Una ventaja de los marcadores RGA deriva de la conservación de regiones específicas dentro de los genes de resistencia clonados a partir de taxones muy diversos, lo que facilita la identificación de motivos similares y, consecuentemente, de nuevos RGAs en especies en las cuales todavía no se han clonado genes de resistencia y para las cuales no se dispone de otro tipo de marcadores.

Los primeros trabajos de caracterización y/o el uso de RGAs también se reportaron en arroz (Chen y col., 1998), arveja (Rivkin y col., 1999), lechuga (Shen y col., 1998), *A. thaliana* (Aarts y col., 1998, Speulman y col., 1998) y maíz (Collins y col., 1998). A partir de estos trabajos, y dado la disminución en los costos de secuenciación, la caracterización de secuencias de tipo RGA fue creciendo en los últimos años, aplicando esta estrategia al estudio de genes de resistencia en distintas plantas, tanto especies modelo como especies cultivadas (Meyers y col., 1999; Wang y col., 2001; Quint y col., 2002; Ramalingam y col., 2003; Meyers y col., 2003; Monosi y col., 2004; Trognitz y Trognitz, 2005; Xiao y col., 2006 y 2007).

Como una alternativa metodológica, surge el uso de iniciadores degenerados sobre motivos específicos del dominio NBS combinado con técnicas basadas en amplificación empleando adaptadores como AFLP-RGA (Hayes y Saghai-Marroof., 2000; Zhang y col., 2007) y Perfiles NBS (*NBS profiling*, van der Linden y col., 2004). Estas metodologías permitieron generar patrones complejos conteniendo varios fragmentos derivados de RGAs. Estos fragmentos pudieron ser directamente mapeados en relación a otros marcadores o a *loci R* (Calenge y col., 2005; Egea-Gilabert y col., 2003; You y col., 2005; Brugmans y col., 2008).

Recientemente, esta metodología de RGAs se aplicó sobre ADNc de papa (en lugar de ADN) poniendo en evidencia la detección de posibles genes *R* que se están transcribiendo (Brugmans y col., 2008).

3.4.1.7. Marcadores derivados de Secuencias Expresadas (ESTs)

Las secuencias ESTs (*Expressed Sequence Tags*) son generadas tomando clones al azar de una colección de ADNc y realizando una sola reacción de secuenciación y, por lo tanto, una sola lectura de la secuencia (la cual no es editada) con una extensión promedio de 300-500 pb. Las genotecas de ADNc contienen decenas de cientos de clones que representan

una variedad de tipos de tejidos específicos y representan una “foto instantánea” de la expresión de los genes en ese tejido durante un estadio del desarrollo definido y/o en respuesta a un estrés biótico o abiótico determinado. El bajo costo relativo de la secuenciación de ESTs y la generación de los mismos de una manera automatizada, hacen de la secuenciación de ESTs la ruta más atractiva para el muestreo amplio del transcriptoma. Asimismo, es una alternativa factible para disponer de una fuente de secuencias sin necesidad de secuenciar completamente un genoma particular (Rudd, 2003). El término EST fue empleado por primera vez en relación al descubrimiento de genes en el contexto del proyecto de secuenciación del genoma humano en 1991 (Adams y col., 1991). A partir de ello, se generaron millones de ESTs pertenecientes a más de 500 especies diferentes (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbEST/dbEST_summary.html).

Se dispone de colecciones de ESTs para varias especies de la familia *Solanaceae* como papa, tomate, pimiento, tabaco, *N. benthamiana* y petunia, entre otras (<http://www.tigr.org/tdb/tgi/plants.shtml> y <http://sgn.cornell.edu>).

Además de ser reactivos claves en metodologías basadas en microarreglos de ADNc para estudios de expresión masiva de genes e identificación de genes candidatos, los ESTs son una fuente de secuencias que es explotada para el desarrollo de marcadores moleculares (Gupta y Rustgi, 2004). En papa, por ejemplo, se generaron marcadores microsatélites a partir de ESTs (Melbourne y col., 1998; Ghislain y col., 2004; Feingold y col., 2005).

A partir de ESTs también se pueden generar marcadores tipo AFLP *in silico*, EST-SNP e InDels (Inserciones/Deleciones), ESTPs (*EST Polymorphism*, Polimorfismos de ESTs) y marcadores COS (*Conserved Orthologue Set*, Conjunto de Ortólogos Conservados) y realizar búsquedas bioinformáticas de RGAs en este tipo de secuencias (Gupta y Rustgi, 2004). La generación de marcadores mediante el análisis de secuencias de ESTs tiene la ventaja de permitir reducir costos como por ejemplo, el desarrollo de SSR sin necesidad de disponer de una genoteca de secuencias repetidas.

Las limitaciones de la generación de marcadores a partir de ESTs están dadas principalmente por la calidad de las secuencias depositadas en las bases de datos. Como se mencionó anteriormente, las secuencias corresponden a una única lectura de secuenciación sin editar, provocando que las mismas contengan errores y dificultando el desarrollo de marcadores de interés (Gupta y Rustgi, 2004).

3.4.2. Los mapas genético-moleculares de referencia en papa y en otras solanáceas

El primer mapa de ligamiento en papa fue construido con marcadores RFLP de tomate, los cuales habían sido mapeados en los 12 grupos de ligamiento de tomate. Este estudio demostró por primera vez la extensa colinearidad genómica entre estas dos especies cercanamente relacionadas (Bonierbale y col., 1988).

En las últimas dos décadas, se desarrollaron varios mapas para papa basados en marcadores RFLP, AFLP, SSR y otros marcadores basados en PCR (Bonierbale y col., 1988; Tanksley y col., 1992; Jacobs y col., 1995; Van Eck y col., 1995; Milbourne y col., 1998; Chen y col., 2001; Gebhardt y col., 1989, 1991 y 2001; Feingold y col., 2005; van Os y col., 2006), disponibles a través de internet mediante diferentes sitios de acceso (<http://gabi.rzpd.de/projects/Pomamo>, Meyer y col., 2005; <http://cbsgdbase.wur.nl/UHD>, van Os y col., 2006). Algunos de esos mapas pueden ser alineados con mapas de tomate y pimiento en base a marcadores RFLP comunes (Tanksley y col., 1992; Livingstone y col., 1999; Lefebvre y col., 2002; Paran y col., 2004). Este tipo de información está disponible a través de internet y de una manera integrada con mapas de otras especies de solanáceas como tabaco y berenjena, y también con *Arabidopsis* (<http://www.sgn.cornell.edu>).

Los mapas de ligamiento moleculares proveen un marco de referencia útil para la localización de *loci* de resistencia a patógenos en el genoma de papa. Usando estos mapas, se localizaron genes que controlan la resistencia monogénica y poligénica a varios patógenos en los 12 cromosomas del genoma de papa (Gebhardt y Valkonen, 2001).

Los experimentos de mapeo llevados a cabo en distintos laboratorios emplean diferentes genotipos de papa, generalmente diploides. Los mapas independientes generados pueden ser alineados a partir de la referencia de marcadores, como los RFLP, comunes entre papa y tomate. Los marcadores RFLP, por ejemplo, sirven de ancla para los distintos mapas permitiendo la integración de la información disponible en un único mapa funcional de papa para resistencia a enfermedades (<http://gabi.rzpd.de/projects/Pomamo>, Gebhardt y Valkonen, 2001). También, se encuentra accesible este tipo de mapas comparativos para la familia *Solanaceae* a través de internet (*Solanaceae Disease Resistance, SOLAR, Gene Database*, http://www.tigr.org/tdb/potato/disease_db/candidates.shtml), como así también a partir de la literatura (Grube y col., 2000).

3.4.3. El Análisis de Grupos de Segregantes (BSA) para el mapeo de *loci* de herencia simple

La localización cromosómica de genes, en este caso de genes *R*, puede ser definida mediante estudios de segregación en relación a marcadores moleculares ligados.

La estrategia de Análisis de Grupos de Segregantes o Análisis de Segregantes Agrupados (BSA: *Bulked Segregant Analysis*) es una técnica alternativa a la generación de un mapa de ligamiento para la identificación de regiones genómicas asociadas a caracteres de herencia simple. Fue desarrollada por Michelmore y col. (1991) y Giovanonni y col. (1991). El procedimiento consiste en detectar diferencias entre dos muestras de ADN agrupados obtenidos de una población segregante. Estas muestras agrupadas (*bulk samples* o *pools*) se construyen mezclando cantidades iguales de ADN de individuos que fueron seleccionados en base a la expresión fenotípica de un carácter (por ejemplo, resistencia a una enfermedad). De esta forma, ambos *pools* serán contrastantes para la característica analizada. Cada muestra agrupada tendrá el mismo genotipo en la región genómica de interés y genotipo al azar en las regiones no ligadas al carácter (**Figura 7**). Como consecuencia, ambas muestras de ADN diferirán solamente en la región seleccionada (presentando polimorfismo) y serán monomórficas para todas las demás regiones.

La selección de los individuos para constituir las muestras agrupadas o *bulks* se realiza identificando los fenotipos extremos de una población segregante para la característica de interés. Por ejemplo, una población (F_2 , retrocruza o dihaploide) de un parental resistente y un parental susceptible a un patógeno se clasifica fenotípicamente. El ADN de los individuos fenotípicamente resistentes se mezcla y compara con otra mezcla de ADN de los individuos fenotípicamente susceptibles (*bulk* resistente y *bulk* susceptible). El ADN de los progenitores y de las dos muestras agrupadas (*bulk* resistente y *bulk* susceptible) se analizan con un gran número de marcadores moleculares buscando aquellos que resulten en bandas presentes en un *bulk* y ausentes en el otro, verificando paralelamente el origen parental del marcador.

Esta evidencia preliminar de ligamiento genético entre un marcador polimórfico y el *locus* de interés, debe ser confirmada a través de un análisis de segregación utilizándose todos los individuos de la población segregante, en un ejercicio tradicional de cosegregación genética entre el marcador y el fenotipo. El ligamiento se confirma y se estima el valor de la frecuencia de recombinación entre el marcador y el *locus* genético que controla el carácter.

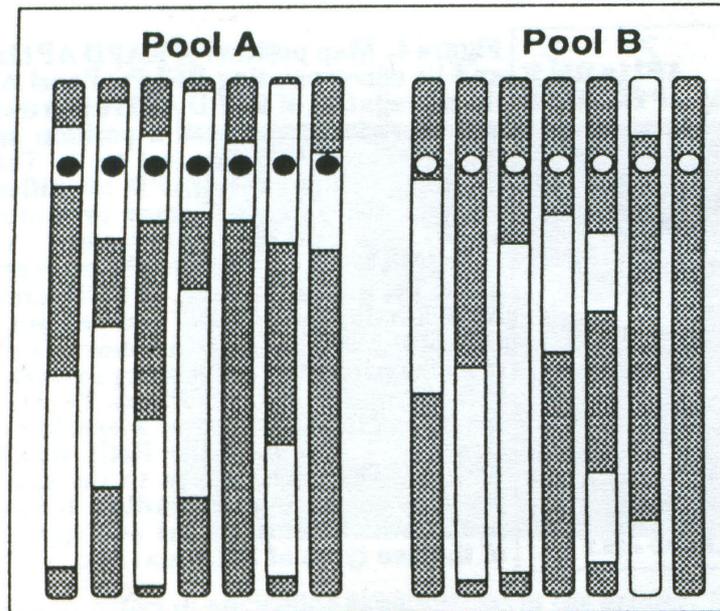


Figura 7. Representación esquemática del Análisis de Grupos de Segregantes (BSA: *Bulked Segregant Analysis*). Los individuos segregantes de una población (en el esquema se representan los genomas de los mismos por cada una de las barras) se agrupan (*Pool A* y *Pool B*) en base a la selección de una característica genotípica o fenotípica (círculos negros o blancos en cada *pool* o *bulk*). Los marcadores moleculares que muestren polimorfismo entre los *pools* identificarán *loci* ligados al *locus* seleccionado, debido a que el fondo genético será semejante entre ambos *pools* como consecuencia del agrupamiento. (Adaptado de Tingey y col., 1994).

Básicamente, la estrategia de BSA utiliza una selección genómica previa para reducir drásticamente el esfuerzo necesario para la identificación de ligamiento, y focaliza el análisis directamente en la región del genoma asociada al carácter de interés. Los marcadores identificados se encuentran en general en una “ventana genética” de 25 cM de cada lado del *locus* de interés (Michelmore y col., 1991). Desde sus inicios, esta estrategia se ha usado exitosamente en la identificación de genes de resistencia en distintas especies vegetales como lechuga (Michelmore y col., 1991; Paran y Michelmore, 1993), tomate (Martin y col., 1991; Thomas y col., 1995; Chagué y col., 1996), avena (Penner y col., 1993), pino (Devey y col., 1995), arroz (Nair y col., 1996), papa (Jacobs y col., 1996), entre otras y se continúa empleando en la actualidad por su simplicidad y efectividad para la identificación de marcadores ligados a características de interés (Grimmer y col., 2007; Li y col., 2008).

El Análisis de Segregantes Agrupados también se puede usar para saturar con marcadores una región del genoma con el objetivo, por ejemplo, de estudios pormenorizados que

lleven eventualmente al clonado de genes y es útil también para identificar marcadores en regiones de mapas genéticos que todavía no fueron cubiertas.

3.4.4. Las Líneas Introgresadas (ILs) de tomate

Las Líneas Introgresadas (ILs: *Introgression Lines*) de tomate son un conjunto de líneas cercanas isogénicas (NILs: *Nearly Isogenic Lines*) obtenidas por Eshed y Zamir (1994).

Las ILs de tomate, cubren la totalidad del genoma de *S. pennellii* mediante segmentos superpuestos en el fondo genético de *S. lycopersicum* cv. M82 (**Figura 8**).

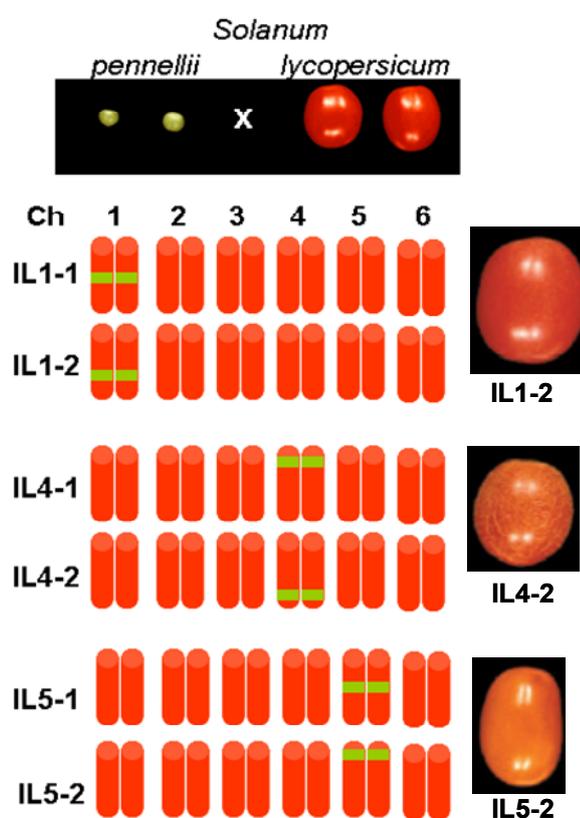


Figura 8. Esquema ilustrativo de la obtención de las líneas introgresadas (ILs) de *S. pennellii*. El esquema representa un ejemplo de líneas introgresadas para los cromosomas 1, 4 y 5. Las ILs fueron obtenidas a través de varias retrocruzas sucesivas y selección asistida por marcadores moleculares para generar un conjunto de líneas con fondo genético de *S. lycopersicum* (en rojo) y segmentos únicos de *S. pennellii* (en verde). Se muestran sólo 6 de los 12 pares de cromosomas (Ch) de tomate (Eshed y Zamir, 1995).

Estas líneas se obtuvieron mediante retrocruzas sucesivas asistidas con marcadores moleculares, empleando *S. pennellii* como parental donante y *S. lycopersicum* como parental recurrente. Las ILs son idénticas entre sí para la totalidad del genoma excepto para

una región introducida única. De esta forma, las variaciones entre las ILs se deben al segmento introgresado en cada uno de los 12 cromosomas de tomate (**Figura 8**).

Esta colección de líneas está compuesta por 76 genotipos los cuales se diferencian entre sí por un segmento genómico homocigota único perteneciente al genoma de *S. pennellii*. El mapa molecular correspondiente a estas líneas está caracterizado en base a los marcadores del mapa de tomate de 1992 (Tanksley y col., 1992). También se caracterizaron en referencia a un mapa más reciente que incluye marcadores RFLP, SSR-ESTs y COS (ExPEN2000 map, <http://www.sgn.cornell.edu>). Estas líneas ofrecen grandes ventajas como herramientas para el mapeo de QTLs y la identificación y localización de genes (Zamir y Eshed, 1995; Zamir, 2001; Gur y Zamir, 2004).

3.4.5. La genoteca de grandes insertos de *S. bulbocastanum*

Desde su introducción como sistema de clonado, los Cromosomas Artificiales Bacterianos (BAC: *Bacterial Artificial Chromosome*) se han utilizado ampliamente en la construcción de genotecas de insertos de gran tamaño (*BAC library*) (Shizuya y col., 1992). Estas genotecas de BACs se emplean extensamente para diferentes análisis de genomas de plantas como por ejemplo, mapeo físico (Lapitan y col., 1997; Song y col., 2000), integración de mapas físicos y mapas genéticos (Tao y col., 2001), análisis citogenético basado en secuencias de clones de BACs (Dong y col., 2000; Hudakova y col., 2001; Lagudah y col., 2001) y clonado posicional de genes (Yang y col., 1998; Zhang y col., 2003). Esto se debe a que los BACs tiene ventajas distintivas sobre los otros sistemas para el desarrollo de genotecas de grandes insertos como son: la fácil manipulación de la bacteria hospedadora *Escherichia coli*, la alta eficiencia de transformación, la fácil recuperación del inserto y la baja frecuencia de rearrreglos (Shizuya y col., 1992; Woo y col., 1994; Wang y col., 1995; Birren y col., 1999).

Song y col. (2000) de la Universidad de Wisconsin de EUA desarrollaron una genoteca de BACs de *S. bulbocastanum*, especie silvestre diploide de papa originaria de México y Guatemala.

La genoteca posee un tamaño promedio de inserto de 155 kpb, con una cobertura del genoma de 3,57 veces (tamaño estimado del genoma: 800 Mpb).

Fue empleada en distintos trabajos para estudios citogenéticos, estabilidad de clones, posibilidad de transformación genética con grandes insertos y clonado de genes (Dong y col., 2000; Song y col., 2000, 2001, 2003a y 2003b; van der Vossen y col., 2003).

La genoteca de BACs de *S. bulbocastanum* es la única genoteca de papa disponible comercialmente (AGI, *Arizona Genomics Institute*, <http://www.genome.arizona.edu/> y CUGI, *Clemson University Genomics Institute*, <http://www.genome.clemson.edu/>) por lo tanto, es una herramienta accesible para realizar diferentes estudios genómicos sobre la misma.

3.4.6. Los proyectos de secuenciación del genoma de tomate y papa

Recientemente, mediante la formación de dos consorcios internacionales, están en proceso de secuenciación los genomas de tomate y papa (<http://www.sgn.cornell.edu> y <http://potatogenome.net>). La Argentina participa en ambos proyectos mediante dos grupos de investigación de INTA.

En el caso de tomate, el grupo es responsable de la secuenciación del genoma mitocondrial (Dr. F. Carrari, <http://www.sgn.cornell.edu>). En octubre de este año salió publicada la primera versión borrador del genoma de esta organela, accesible por el sitio <http://www.mitochondrialgenome.org>.

El Consorcio de Secuenciación del Genoma de Papa (*Potato Genome Sequencing Consortium*) realiza la secuenciación genómica mediante la estrategia de “BAC por BAC”. En ese sentido, el consorcio tiene como objetivo secuenciar completamente unos 8400 BACs para cubrir la totalidad del genoma de papa, el cual posee un tamaño de 840 Mb. El grupo argentino está secuenciando el cromosoma III junto con grupos de investigación de Brasil, Chile y Perú (Dr. S. Feingold, <http://potatogenome.net/!@PartnerPane.html>), cubriendo hasta noviembre de este año 3,5% de la secuencia correspondiente a este cromosoma.

Así, en un futuro cercano, estarán disponibles las secuencias genómicas de estas dos especies impactando favorablemente en los distintos proyectos de investigación que involucren a las mismas o a otras especies de la familia *Solanaceae*.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

❖ Caracterizar desde el punto de vista genético una nueva fuente de resistencia extrema al *Virus X de la Papa* (PVX) presente en *Solanum commersonii*. Esto incluye el análisis de la herencia de la misma y la localización de la región cromosómica que contiene el *locus* de interés, utilizando diferentes estrategias genómicas.

4.2. Objetivos específicos

- Estudiar la segregación del carácter de interés mediante el análisis de la respuesta fenotípica frente a la infección con la cepa hipervirulenta MS del PVX empleando tres poblaciones provenientes de la EEA INTA-Balcarce, resultantes de los cruzamientos entre un genotipo resistente y tres genotipos susceptibles.
- Estudiar la localización cromosómica del gen de resistencia extrema presente en *S. commersonii* y analizar la presencia de secuencias homólogas a otros genes de resistencia a PVX caracterizados previamente en papa, aprovechando el conocimiento disponible públicamente para este sistema.
- Aplicar la estrategia de Análisis de Segregantes Agrupados (BSA) combinada con diferentes metodologías de marcadores moleculares (RFLP, RAPD, AFLP, AFLP-RGA y RGA) para la identificación de marcadores ligados al gen de resistencia extrema Rx_{cmm} presente en *S. commersonii*.
- Estudiar a nivel de secuencia los marcadores ligados al gen Rx_{cmm} de manera individual, para obtener información adicional sobre el *locus* donde se localiza el gen de interés y de esta manera diseñar nuevas estrategias para el mapeo del mismo.
- Aprovechar las herramientas genómicas generadas en otras especies de la familia *Solanaceae* para estudiar y referenciar los marcadores ligados obtenidos.

- Analizar marcadores de la región cromosómica en estudio, descritos en otras especies de *Solanum*, para generar nuevos marcadores útiles para el mapeo y localización del gen en *S. commersonii*
- Generar un mapa de ligamiento de marcadores moleculares del *locus* que contiene al gen Rx_{cmm} y definir su localización cromosómica.

5. HIPÓTESIS

Las hipótesis de trabajo son:

- a) La resistencia extrema frente a PVX MS caracterizada en *S. commersonii* puede ser analizada desde el punto de vista genético de segregación mendeliana.
- b) Existen diferencias moleculares en el ADN entre el alelo que confiere resistencia y sus regiones flanqueantes presente en uno de los padres del cruzamiento con respecto a la región homóloga en el padre susceptible.
- c) Estas diferencias pueden ser detectadas con alguna de las técnicas de generación de marcadores moleculares utilizadas (RFLP, RAPD, AFLP, AFLP-RGA, RGA).
- d) La conservación a nivel de secuencia de los dominios presentes en los genes de resistencia a enfermedades en plantas y las estrategias que involucran este concepto (RGA, AFLP-RGA, homólogos a genes *Rx*) pueden ser aplicadas exitosamente en *S. commersonii*.
- e) La sintenia observada entre distintas especies de la familia *Solanaceae* es compartida por *S. commersonii* permitiendo emplear distintas estrategias basadas en genómica comparativa contribuyendo a la localización genómica de la región que porta la resistencia extrema frente a PVX MS.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Material vegetal

Se utilizaron tres poblaciones de *S. commersonii* segregantes para el carácter resistencia a PVX MS, gentilmente provistas por la Ing. Agr. Elsa Camadro de la Unidad Integrada UNMdP-INTA-Balcarce. Dada la existencia de autoincompatibilidad, característica de las especies diploides de este género, se trabajó con la primera generación de individuos. Los cruzamientos fueron entre un genotipo resistente por tres genotipos susceptibles. Entre las tres poblaciones se contó con un total de aproximadamente 100 individuos.

Las poblaciones se enumeran a continuación, detallándose los parentales de cada cruzamiento de acuerdo con la denominación de INTA-Balcarce (según Ing. Agr. E. Camadro):

Población 78 = B8R-5138 x B7F-5138 Número de individuos: 50

Población 93 = B8R-5138 x 19.5138 Número de individuos: 51

Población 1007 = B8R-5138 x 6.5138 Número de individuos: 16

No se tuvo acceso a los individuos parentales de estos cruzamientos debido a que los mismos se perdieron lamentablemente. En consecuencia, no estuvieron disponibles para el trabajo de esta tesis. Por lo tanto, no pudieron ser utilizados como importantes controles para los distintos ensayos realizados.

El cultivar *Huinkul* MAG que no porta genes de resistencia a PVX conocidos, se utilizó como control susceptible en los estudios de determinación del fenotipo.

Se utilizaron tres poblaciones de referencia para el trabajo de localización cromosómica:

1) una población de *S. tuberosum* correspondiente al mapa ultra denso de papa (UHD: *Ultra High Density Map*, <http://www.dpw.wageningen-ur.nl/uhd>) provista por el Dr. E. Ritter (NEIKER-Tecnalia, España), conformada por los dos parentales del cruzamiento (denominados RH y SH) y 90 individuos progenie y disponible como ADN

2) mediante una colaboración con el grupo de la Dra. C. Gebhardt (*Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung*, Köln, Alemania) se tuvo acceso a la población de mapeo F1840 (Gebhardt y col., 1991). La población de referencia está compuesta por 100 individuos F1, proveniente de un cruzamiento entre dos líneas diploides heterocigotas de papa (H82.337/49, P18 parental femenino y H80.696/4, P40 parental masculino, híbrido entre

S. tuberosum ssp. tuberosum y *S. spegazzini*)

3) una colección de Líneas Introgresadas (ILs) de *S. pennellii* provenientes del *Tomato Genetics Resource Center Dept. of Vegetable Crops*, Universidad de California, Davis, EUA y disponible como semilla botánica (<http://tgrc.ucdavis.edu/>). Este grupo de Líneas Introgresadas fue desarrollado por Eshed y Zamir (1994). Cada IL (excepto IL8-1) es homocigota para una introgresión simple de *S. pennellii* (LA0716) en el fondo genético de *S. lycopersicum* cv. M-82 (LA3475). El genoma completo de *S. pennellii* está así representado por introgresiones superpuestas en un grupo de 50 líneas.

El número seguido a la abreviatura “IL” indica el número del cromosoma de *S. pennellii*, seguido de un guión se encuentra un segundo número que indica el número correspondiente a la región cromosómica del segmento introgresado en cada línea. Estas líneas se listan a continuación (**Tabla 2**).

Tabla 2. Número de acceso (LA) y nombre de las líneas (Línea) correspondientes a la colección de Líneas Introgresadas de *S. pennellii* (LA0716) en el fondo genético de *S. lycopersicum* cv. M-82 (LA3475). Los detalles de la codificación para la nomenclatura de las líneas se explican en el texto.

LA	Línea	LA	Línea	LA	Línea
4028	IL1-1	4051	IL4-3	4074	IL8-2
4031	IL1-2	4053	IL4-4	4076	IL8-3
4032	IL1-3	4054	IL5-1	4078	IL9-1
4033	IL1-4	4055	IL5-2	4081	IL9-2
4035	IL2-1	4056	IL5-3	4084	IL9-3
4037	IL2-2	4057	IL5-4	4087	IL10-1
4038	IL2-3	4058	IL5-5	4089	IL10-2
4039	IL2-4	4059	IL6-1	4091	IL10-3
4040	IL2-5	4060	IL6-2	4092	IL11-1
4041	IL2-6	4062	IL6-3	4093	IL11-2
4043	IL3-1	4063	IL6-4	4094	IL11-3
4044	IL3-2	4064	IL7-1	4095	IL11-4
4045	IL3-3	4065	IL7-2	4097	IL12-1
4046	IL3-4	4066	IL7-3	4099	IL12-2
4047	IL3-5	4067	IL7-4	4100	IL12-3
4048	IL4-1	4069	IL7-5	4102	IL12-4
4050	IL4-2	4071	IL8-1		

6.2. Raza viral utilizada para evaluar la resistencia

Se utilizó la raza viral PVX MS que es capaz de superar los mecanismos de resistencia mediados por los genes *Nx*, *Nb* y *Rx* (Tozzini y col., 1994). De acuerdo con la determinación serológica, esta raza pertenece al serotipo PVX⁰ (común o de distribución mundial) definido por Fernández-Northcote y Lizárraga (1991).

El aislamiento de PVX MS, originalmente provisto por el Dr. J. Muñoz de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad de Córdoba, se propagó en plantas de tabaco variedad Xanthi. Las hojas infectadas se conservaron a -80°C como fuente de inóculo.

6.3. Cultivo de las plantas

Los genotipos correspondientes a la progenie de las tres poblaciones de *S. commersonii* llegaron al Laboratorio como semilla botánica libre de virus desde el Laboratorio de Genética de la EEA INTA-Balcarce. Las semillas se desinfectaron en una solución de hipoclorito de sodio al 50% durante 5 min, luego se enjuagaron una vez en alcohol 70% y dos veces en agua estéril (Gamborg y col., 1981).

Finalizada la desinfección, se pusieron a germinar en cajas de Petri conteniendo medio Murashige-Skoog de cultivo *in vitro* con 7% de agar (Masson y col., 1987) en condiciones asépticas y controladas de luz y temperatura (16/8 hs (día/noche) de fotoperíodo, a 23°C±4°C). Posteriormente, las plántulas logradas fueron transferidas a tubos de borosilicato de 2 cm de diámetro manteniendo las mismas condiciones de cultivo descriptas. Cada una de estas plántulas fue identificada con un número. Estos individuos fueron multiplicados por micropropagación de manera periódica, con el fin de mantener las poblaciones y de asegurar la disponibilidad del material necesario para realizar los ensayos biológicos correspondientes.

Paralelamente, las plantas se mantuvieron en macetas de 5 litros de capacidad con sustrato (tierra 30%, turba 50%, estiércol 10%, perlita 10%) en invernáculo, en condiciones de fotoperíodo de 16/8 hs (día/noche) y a 25°C±5°C.

Las semillas correspondientes a la población de Líneas Introgresadas de *S. pennellii* en *S. lycopersicum* fueron germinadas y crecidas en macetas en las condiciones descriptas en el párrafo anterior.

6.4. Preparación del inóculo e infección de las plantas

Se realizó la preparación del inóculo e infección de las plantas siguiendo la metodología descrita por Tozzini y col. (1994).

Para ser inoculadas mecánicamente se seleccionaron plantas de 10 días desde la micropropagación, con dos o tres nudos y que estuvieran recién comenzando a desarrollar raíces.

El inóculo se preparó homogeneizando hojas de tabaco infectadas con PVX MS en un mortero conteniendo el buffer de extracción viral (NaCl 8 g/l, KH₂PO₄ 0,2 g/l, Na₂HPO₄.12H₂O 2,9 g/l, KCl 0,2 g/l, PVP 10.000 20 g/l, pH 7,4) a razón de 10 ml/g de hoja y en frío. La suspensión se centrifugó durante 5 min a 5.000 rpm, se recuperó el sobrenadante y a éste se le agregó *carburundum* a una concentración final de 150 mg/ml. El inóculo se aplicó a una hoja que estuviera completamente expandida utilizando un hisopo de algodón y en forma muy suave. Las plantas así tratadas se colocaron en cámara de cría con condiciones de fotoperíodo 16/8 hs (día/noche), a 20°C +/-2°C.

Luego de 25-30 días se cuantificó la infección mediante la técnica de ELISA.

Se inocularon un mínimo de 3 y un máximo de 5 plantas por genotipo (clon) de cada una de las poblaciones segregantes junto con plantas susceptibles control (cultivar de papa *Huinkul*-MAG) distribuidas regularmente entre éstas.

6.5. Determinación del grado de infección mediante detección inmunológica-ELISA

Los ensayos de ELISA para la detección de PVX se realizaron según Hopp y col. (1991). Las muestras de tejido fresco proveniente de hojas se colocaron en un tubo cónico de polipropileno de 1,5 ml (Eppendorf) y se homogeneizaron en presencia de buffer de extracción viral, a razón de 10 µl/mg de tejido, con ayuda de un microémbolo plástico. Posteriormente, se clarificaron mediante una centrifugación a 10.000 rpm durante 2 min. Los ensayos inmunológicos se hicieron en *strips* (módulos de microplacas, Nunc-*Immuno Module*) usando un espectrofotómetro de 8 canales automático Titertek Multiscan MC (Flow Laboratory). Se realizaron ensayos de ELISA doble *sandwich* utilizando anticuerpos policlonales contra la proteína de cápside viral, empleando un kit comercial (*Enzyme immunoassay for the in vitro detection of Potato Virus X*, Boehringer Mannheim), siguiendo las instrucciones del proveedor.

Paralelamente, se construyó una curva de calibración aplicando distintas diluciones de

virus PVX MS purificado en un rango de 0 a 4.000 ng por cavidad y se ensayaron los controles susceptibles (cultivar *Huinkul* MAG).

La infección se cuantificó utilizando anticuerpo anti PVX conjugado a fosfatasa alcalina que, luego del agregado del sustrato-cromógeno, da un producto de reacción coloreado medible por lectura espectrofotométrica a 405 nm.

De acuerdo con el resultado de la curva de calibración y de las plantas susceptibles control se adoptó el criterio para considerar positiva (susceptible) o negativa (resistente) a cada una de las muestras en cada ensayo.

6.6. Extracción de ADN

El ADN de las plantas se extrajo mediante el método del CTAB (*Cetyl TrimethylAmmonium Bromide*, bromuro de hexadecil-trimetil-amonio) modificado por Saghai-Marooof y col. (1994). Primero, se pulverizó en presencia de nitrógeno líquido 100 a 500 mg de hojas frescas en un mortero. El tejido así obtenido fue incubado en buffer CTAB (Tris 100 mM pH 7,5; NaCl 700 mM; EDTA 50 mM pH 8,0; CTAB 1%; 2-mercaptoetanol 140 mM) durante 60-90 min a 65°C con agitación. Luego de tratar con cloroformo:octanol (24:1 v/v) se precipitó el ADN con isopropanol (2:3 v/v) y se lavó con etanol 76% /AcONa 0,2 M y etanol 76% /AcONH₄ 10 mM.

Se cuantificó el ADN obtenido mediante espectrofotometría ultravioleta asumiendo una equivalencia de 1 DO(260 nm)=50 µg y paralelamente se verificó la integridad del mismo mediante electroforesis en gel de agarosa 1% y TAE 1X (Tris 40 mM, AcONa 5 mM, EDTA 0,77 mM, pH 8), teñido posteriormente con bromuro de etidio 10 mg/ml (Sambrook y col., 1989). Finalmente, los ADNs se llevaron a una concentración final de 100 ng/µl.

6.7. Análisis de segregación en mezclas de ADN (BSA: *Bulked Segregant Analysis*)

Para identificar marcadores específicamente ligados al alelo de resistencia, se utilizó la estrategia de análisis de grupos de segregantes o análisis de segregantes agrupados (*bulked segregant analysis*) descrita por Michelmore y col. (1991) y Giovannoni y col. (1991). La estrategia de BSA permite la identificación rápida y eficaz de marcadores ligados a genes de interés. El método consiste en construir dos grupos (*bulks*) de ADN de individuos de una población segregante, un grupo que presenta el carácter a estudiar y el otro que no lo presenta (en general, se analizan caracteres de tipo monogénico). Dentro de cada grupo o

bulk de ADN, los individuos serán idénticos para la región genómica alrededor del gen de interés, pero diferentes para el resto de los genes del genoma. Entre ambos grupos, al realizarse la mezcla de ADN de diferentes individuos, el fondo genético se homogeneiza y será semejante para ambos. Por este motivo, los marcadores que sean polimórficos entre los dos grupos estarán generalmente ligados al gen responsable del carácter para el que se construyeron los *bulks*. Finalmente, se debe confirmar en la población segregante que existe ligamiento entre el marcador obtenido por esta técnica y el gen estudiado.

En este trabajo se utilizó la técnica de BSA para buscar marcadores ligados al *locus* de resistencia al PVX MS utilizando distintas técnicas de marcadores moleculares, generando así pares de *bulks* de ADN de individuos resistentes y susceptibles a PVX. El análisis de RAPD se realizó con la mezcla de ADN de 11 individuos resistentes (*bulk* B2R) y 10 individuos susceptibles (*bulk* B2S) a PVX, mezcladas en cantidades equimolares (50 ng de ADN de cada individuo). Para AFLP se utilizó el ADN mezclado de 24 individuos resistentes (*bulk* B3R) y 21 susceptibles (*bulk* B3S) al PVX, mezclados también en cantidades equimolares (50 ng de cada individuo) de acuerdo con trabajos previos (Martínez, 1997). Para las demás metodologías de marcadores moleculares, se emplearon los *bulks* B2R y B2S o los *bulks* B1R y B1S de 7 individuos resistentes y 5 susceptibles al PVX, respectivamente, mezclando cantidades equimolares de ADN (50 ng de cada uno) de acuerdo con el nivel de polimorfismo esperado a detectar. Los *bulks* B3R y B3S incluyen los individuos de los *bulks* B2R y B2S y estos últimos incluyen los individuos de los *bulks* B1R y B1S y corresponden todos a la población 78 de *S. commersonii*.

6.8. Análisis mediante RAPD

Se empleó la metodología de RAPD (Williams y col., 1990; Welsh y McClelland, 1990) para la especie silvestre de papa *S. commersonii* ajustada y descrita en Martínez (1997).

Se utilizó como templado el ADN genómico de los grupos de segregantes (*bulks*) o de los individuos segregantes de manera independiente, a una concentración final de 50 ng por reacción y empleando la enzima ADN polimerasa termoestable fragmento Stoffel (AmpliTaq® DNA Polymerase, Stoffel Fragment, Applied Biosystems). Esta enzima es una forma modificada de 61 kDa de la Taq ADN Polimerasa recombinante (AmpliTaq® DNA Polymerase) y carece de actividades 3'-5' y 5'-3' exonucleasa. Otra característica de la enzima es que se le han eliminado unos 289 aminoácidos del extremo N-terminal para aumentar la exigencia de la PCR en condiciones de menor fuerza iónica y reducir la

extensión errónea. Es más termoestable que las enzimas de uso regular en PCR y es capaz de mantener una actividad óptima dentro de un rango amplio de concentraciones de magnesio y de amplificar fragmentos pequeños con mayor reproducibilidad.

Se utilizaron los iniciadores (10 pb de longitud) de las series A, B, C, D, F, G, H, I, J, K, L, M, N, X, Y, AA y AB (OPERON Biotechnologies). Los iniciadores que forman parte de estas series se listan (secuencia en sentido 5'-3') a continuación:

Iniciadores Serie A

A-01 CAGGCCCTTC	A-06 GGTCCCTGAC	A-11 CAATCGCCGT	A-16 AGCCAGCGAA
A-02 TGCCGAGCTG	A-07 GAAACGGGTG	A-12 TCGGCGATAG	A-17 GACCGCTTGT
A-03 AGTCAGCCAC	A-08 GTGACGTAGG	A-13 CAGCACCCAC	A-18 AGGTGACCGT
A-04 AATCGGGCTG	A-09 GGGTAACGCC	A-14 TCTGTGCTGG	A-19 CAAACGTCGG
A-05 AGGGGTCTTG	A-10 GTGATCGCAG	A-15 TTCCGAACCC	A-20 GTTGCGATCC

Iniciadores Serie B

B-01 GTTTCGCTCC	B-06 TGCTCTGCCC	B-11 GTAGACCCGT	B-16 TTTGCCCGGA
B-02 TGATCCCTGG	B-07 GGTGACGCAG	B-12 CCTTGACGCA	B-17 AGGGAACGAG
B-03 CATCCCCCTG	B-08 GTCCACACGG	B-13 TTCCCCCGCT	B-18 CCACAGCAGT
B-04 GGAAGTGGAGT	B-09 TGGGGGACTC	B-14 TCCGCTCTGG	B-19 ACCCCCCAAG
B-05 TGCGCCCTTC	B-10 CTGCTGGGAC	B-15 GGAGGGTGTT	B-20 GGACCCTTAC

Iniciadores Serie C

C-01 TTCGAGCCAG	C-06 GAACGGACTC	C-11 AAAGCTGCGG	C-16 CACACTCCAG
C-02 GTGAGGCGTC	C-07 GTCCCGACGA	C-12 TGTCATCCCC	C-17 TTCCCCCAG
C-03 GGGGGTCTTT	C-08 TGGACCGGTG	C-13 AAGCCTCGTC	C-18 TGAGTGGGTG
C-04 CCGCATCTAC	C-09 CTCACCGTCC	C-14 TGCCTGCTTG	C-19 GTTGCCAGCC
C-05 GATGACCGCC	C-10 TGTCTGGGTG	C-15 GACGGATCAG	C-20 ACTTCGCCAC

Iniciadores Serie D

D-01 ACCGCGAAGG	D-06 ACCTGAACGG	D-11 AGCGCCATTG	D-16 AGGGCGTAAG
D-02 GGACCCAACC	D-07 TTGGCACGGG	D-12 CACCGTATCC	D-17 TTTCCACGG
D-03 GTCGCCGTCA	D-08 GTGTGCCCCA	D-13 GGGGTGACGA	D-18 GAGAGCCAAC
D-04 TCTGGTGAGG	D-09 CTCTGGAGAC	D-14 CTTCGCCAAG	D-19 CTGGGGACTT
D-05 TGAGCGGACA	D-10 GGTCTACACC	D-15 CATCCGTGCT	D-20 ACCCGGTCAC

Iniciadores Serie F

F-01 ACGGATCCTG	F-06 GGGGAATTCGG	F-11 TTGGTACCCC	F-16 GGAGTACTGG
F-02 GAGGATCCCT	F-07 CCGATATCCC	F-12 ACGGTACCAG	F-17 AACCCGGGAA
F-03 CCTGATCACC	F-08 GGGATATCGG	F-13 GGCTGCAGAA	F-18 TTCCCGGGTT
F-04 GGTGATCAGG	F-09 CCAAGCTTCC	F-14 TGCTGCAGGT	F-19 CCTCTAGACC
F-05 CCGAATTCCT	F-10 GGAAGCTTGG	F-15 CCAGTACTCC	F-20 GGTCTAGAGG

Iniciadores Serie G

G-01 CTACGGAGGA	G-06 GTGCCTAACC	G-11 TGCCCGTCGT	G-16 AGCGTCCTCC
G-02 GGCAGTGGAG	G-07 GAACCTGCGG	G-12 CAGCTCACGA	G-17 ACGACCGACA
G-03 GAGCCCTCCA	G-08 TCACGTCCAC	G-13 CTCTCCGCCA	G-18 GGCTCATGTG
G-04 AGCGTGTCTG	G-09 CTGACGTACAC	G-14 GGATGAGACC	G-19 GTCAGGGCAA
G-05 CTGAGACGGA	G-10 AGGGCCGTCT	G-15 ACTGGGACTC	G-20 TCTCCCTCAG

Iniciadores Serie H

H-01 GGTCCGAGAA	H-06 ACGCATCGCA	H-11 CTTCGCAGT	H-16 TCTCAGCTGG
H-02 TCGGACGTGA	H-07 CTGCATCGTG	H-12 ACGCGCATGT	H-17 CACTCTCCTC
H-03 AGACGTCCAC	H-08 GAAACACCCC	H-13 GACGCCACAC	H-18 GAATCGGCCA
H-04 GGAAGTCGCC	H-09 TGTAGCTGGG	H-14 ACCAGGTTGG	H-19 CTGACCAGCC
H-05 AGTCGTCCCC	H-10 CCTACGTACAG	H-15 AATGGCGCAG	H-20 GGGAGACATC

Iniciadores Serie I

I-01 ACCTGGACAC	I-06 AAGGCGGCAG	I-11 ACATGCCGTG	I-16 TCTCCGCCCT
I-02 GGAGGAGAGG	I-07 CAGCGACAAG	I-12 AGAGGGCACA	I-17 GGTGGTGATG
I-03 CAGAAGCCCA	I-08 TTTGCCCGGT	I-13 CTGGGGCTGA	I-18 TGCCAGCCT
I-04 CCGCTAGTC	I-09 TGGAGAGCAG	I-14 TGACGGCGGT	I-19 AATGCGGGAG
I-05 TGTTCCACGG	I-10 ACAACGCGAG	I-15 TCATCCGAGG	I-20 AAAGTGCGGG

Iniciadores Serie J

J-01 CCCGGCATAA	J-06 TCGTTCCGCA	J-11 ACTCCTGCGA	J-16 CTGCTTAGGG
J-02 CCCGTTGGGA	J-07 CCTCTCGACA	J-12 GTCCCGTGGT	J-17 ACGCCAGTTC
J-03 TCTCCGCTTG	J-08 CATAACGTTG	J-13 CCACACTACC	J-18 TGTCGCGAGA
J-04 CCGAACACGG	J-09 TGAGCCTCAC	J-14 CACCCGGATG	J-19 GGACACCACT
J-05 CTCCATGGGG	J-10 AAGCCCAGAG	J-15 TGTAGCAGGG	J-20 AAGCGGCCTC

Iniciadores Serie K

K-01 CATTGAGCC	K-06 CACCTTTCCC	K-11 AATGCCCCAG	K-16 GAGCGTCGAA
K-02 GTCTCCGCAA	K-07 AGCGAGCAAG	K-12 TGGCCCTCAC	K-17 CCCAGCTGTG
K-03 CCAGCTTAGG	K-08 GAACACTGGG	K-13 GGTTGTACCC	K-18 CCTAGTCGAG
K-04 CCGCCCAAAC	K-09 CCCTACCGAC	K-14 CCCGCTACAC	K-19 CACAGGCGGA
K-05 TCTGTGAGG	K-10 GTGCAACGTG	K-15 CTCCTGCCAA	K-20 GTGTCGCGAG

Iniciadores Serie L

L-01 GGCATGACCT	L-06 GAGGGAAGAG	L-11 ACGATGAGCC	L-16 AGGTTGCAGG
L-02 TGGGCGTCAA	L-07 AGGCGGGAAC	L-12 GGGCGGTACT	L-17 AGCCTGAGCC
L-03 CCAGCAGCTT	L-08 AGCAGGTGGA	L-13 ACCGCCTGCT	L-18 ACCACCCACC
L-04 GACTGCACAC	L-09 TGCGAGAGTC	L-14 GTGACAGGCT	L-19 GAGTGGTGAC
L-05 ACGCAGGCAC	L-10 TGGGAGATGG	L-15 AAGAGAGGGG	L-20 TGGTGGACCA

Iniciadores Serie M

M-01 GTTGGTGGCT	M-06 CTGGGCAACT	M-11 GTCCACTGTG	M-16 GTAACCAGCC
M-02 ACAACGCCTC	M-07 CCGTACTCA	M-12 GGGACGTTGG	M-17 TCAGTCCGGG
M-03 GGGGGATGAG	M-08 TCTGTTCCCC	M-13 GGTGGTCAAG	M-18 CACCATCCGT
M-04 GGCGTTGTC	M-09 GTCTTGCGGA	M-14 AGGGTCGTTT	M-19 CCTTCAGGCA
M-05 GGGAACGTGT	M-10 TCTGGCGCAC	M-15 GACCTACCAC	M-20 AGGTCTTGGG

Iniciadores Serie N

N-01 CTCACGTTGG	N-06 GAGACGCACA	N-11 TCGCCGCAAA	N-16 AAGCGACCTG
N-02 ACCAGGGGCA	N-07 CAGCCCAGAG	N-12 CACAGACACC	N-17 CATTGGGGAG
N-03 GGTACTCCCC	N-08 ACCTCAGCTC	N-13 AGCGTCACTC	N-18 GGTGAGGTCA
N-04 GACCGACCCA	N-09 TGCCGGCTTG	N-14 TCGTGCGGGT	N-19 GTCCGTACTG
N-05 ACTGAACGCC	N-10 ACAACTGGGG	N-15 CAGCGACTGT	N-20 GGTGCTCCGT

Iniciadores Serie X

X-01 CTGGGCACGA	X-06 ACGCCAGAGG	X-11 GGAGCCTCAG	X-16 CTCTGTTCCG
X-02 TTCCGCCACC	X-07 GAGCGAGGCT	X-12 TCGCCAGCCA	X-17 GACACGGACC
X-03 TGGCGCAGTG	X-08 CAGGGGTGGA	X-13 ACGGGAGCAA	X-18 GACTAGGTGG
X-04 CCGCTACCGA	X-09 GGTCTGGTTG	X-14 ACAGGTGCTG	X-19 TGGCAAGGCA
X-05 CCTTCCCTC	X-10 CCCTAGACTG	X-15 CAGACAAGCC	X-20 CCCAGCTAGA

Iniciadores Serie Y

Y-01 GTGGCATCTC	Y-06 AAGGCTCACC	Y-11 AGACGATGGG	Y-16 GGGCCAATGT
Y-02 CATCGCCGCA	Y-07 AGAGCCGTCA	Y-12 AAGCCTGCGA	Y-17 GACGTGGTGA
Y-03 ACAGCCTGCT	Y-08 AGGCAGAGCA	Y-13 GGGTCTCGGT	Y-18 GTGGAGTCAG
Y-04 GGCTGCAATG	Y-09 AGCAGCGCAC	Y-14 GGTCGATCTG	Y-19 TGAGGGTCCC
Y-05 GGCTGCGACA	Y-10 CAAACGTGGG	Y-15 AGTCGCCCTT	Y-20 AGCCGTGGAA

Iniciadores Serie AA

AA-01 AGACGGCTCC	AA-06 GTGGGTGCCA	AA-11 ACCCGACCTG	AA-16 GGAACCCACA
AA-02 GAGACCAGAC	AA-07 CTACGCTCAC	AA-12 GGACCTCTTG	AA-17 GAGCCCGACT
AA-03 TTAGCGCCCC	AA-08 TCCGCAGTAG	AA-13 GAGCGTCGCT	AA-18 TGGTCCAGCC
AA-04 AGGACTGCTC	AA-09 AGATGGGCAG	AA-14 AACGGGCCAA	AA-19 TGAGGCGTGT
AA-05 GGCTTTAGCC	AA-10 TGGTCCGGTG	AA-15 ACGGAAGCCC	AA-20 TTGCCTTCGG

Iniciadores Serie AB

AB-01 CCGTCGGTAG	AB-06 GTGGTTGGA	AB-11 GTGCGCAATG	AB-16 CCCGGATGGT
AB-02 GGAAACCCCT	AB-07 GTAAACCGCC	AB-12 CCTGTACCGA	AB-17 TCGCATTCCAG
AB-03 TGGCGCACAC	AB-08 GTTACGGACC	AB-13 CCTACCGTGG	AB-18 CTGGCGTGTC
AB-04 GGCACGCGTT	AB-09 GGGCGACTAC	AB-14 AAGTGCGACC	AB-19 ACACCGATGG
AB-05 CCCGAAGCGA	AB-10 TTCCCTCCCA	AB-15 CCTCCTTCTC	AB-20 CTTCTCGGAC

Las reacciones de amplificación se realizaron en un volumen de 25 µl conteniendo:

Componentes	Concentración final
Stoffel Buffer 10X (Applied Biosystem)	1X
(KCl 100 mM, Tris-HCl 100 mM, pH 8,3)	
MgCl ₂ 25 mM	4,00 mM
dNTP 10 mM	0,10 mM
Decámero Iniciador 16 ng/µl	0,64 ng/µl
Taq Stoffel 10 U/µl	0,08 U/µl
ADN 10 ng/µl	2,00 ng/µl

Se utilizó un termociclador TC 480 (Perkin Elmer Cetus) empleando el siguiente programa:

1 ciclo de:	40 ciclos de:	1 ciclo de:
94°C 1 min	94°C 1 min	72°C 7 min
	35°C 1 min	
	72°C 2 min	

Los productos de amplificación se resolvieron mediante electroforesis en geles de agarosa 1,5%, TAE 1X, 8 V/cm durante 4 hs, teñidos con bromuro de etidio 10 mg/ml. Posteriormente, se visualizaron mediante el empleo de un transiluminador de luz UV y se fotografiaron mediante el empleo de un sistema de foto-documentación (Fotodyne).

6.9. Análisis mediante AFLP

Se ajustó la técnica modificada de la versión original (Vos y col., 1995) descrita en Milbourne y col. (1997) y puesta a punto para *S. commersonii* (Martínez, 1997). Esta técnica involucra cuatro pasos:

- 1) Digestión con dos enzimas de restricción del ADN de interés y ligación con adaptadores de los fragmentos de restricción obtenidos, generando así el templado para PCR.
- 2) Pre-amplificación del templado primario con iniciadores que poseen un nucleótido selectivo en 3' (iniciadores +1).
- 3) Amplificación con iniciadores que poseen tres nucleótidos selectivos en 3' (iniciadores +3).

4) Separación de los fragmentos amplificados mediante electroforesis en geles de poliacrilamida.

6.9.1. Digestión y ligación

Se digirió 1 µg de ADN genómico de cada individuo de las tres poblaciones con las enzimas de restricción *EcoRI* y *MseI* durante 4 hs a 37°C en un volumen final de reacción de 50 µl conteniendo:

Componentes	Concentración final
Buffer RL 5X	1X
(AcOMg 50 mM, 250 mM AcOK, Tris-Cl 50 mM, pH 7,5, DTT 25 mM, BSA 250 ng/µl)	
<i>EcoRI</i> 10 U/µl	0,10 U/µl
<i>MseI</i> 4 U/µl	0,10 U/µl
ADN 0,1 µg/µl	0,02 µg/µl

RL: Restricción-Ligación

Se verificó que hubiera digestión total sembrando 5 µl de la reacción en un gel de agarosa 1,5%, TAE 1X, 8 V/cm y posterior electroforesis y visualización bajo luz UV.

Posteriormente, se ligaron los fragmentos de ADN obtenidos con los adaptadores correspondientes a cada enzima durante 4 hs a 37°C. Se utilizaron los 45 µl de producto de la digestión anterior, siendo el volumen final de reacción de 50 µl conteniendo:

Componentes	Concentración final
Buffer RL 5X	1X
Adaptador <i>EcoRI</i> 5 µM	0,10 µM
Adaptador <i>MseI</i> 50 µM	1,00 µM
ATP 10 mM	0,24 mM
T4 ADN Ligasa 10 U/µl (Gibco)	0,20 U/µl

RL: Restricción-Ligación

Adaptador *EcoRI*: 5' CTCGTAGACTGCGTACC 3'
 3'CTGACGCATGGTTAA 5'

Adaptador *MseI*: 5' GACGATGAGTCCTGAG 3'
 3'TACTCAGGACTCAT 5'

6.9.2. Pre-amplificación

Las reacciones de pre-amplificación se realizaron usando como templado 4 µl del producto obtenido en el paso anterior para cada uno de los individuos. Se utilizó la enzima AmpliTaq ADN polimerasa LD (*AmpliTaq® DNA Polymerase, LD*, Applied Biosystems)

en un volumen final de 25 μ l, conteniendo:

Componentes	Concentración final
PCR Buffer10X /MgCl ₂ 25mM (AB)	1X/1,5 mM
dNTP 5 mM	0,20 mM
Iniciador <i>EcoRI</i> (+1) 1 μ g/ μ l	3,00 ng/ μ l
Iniciador <i>MseI</i> (+1) 1 μ g/ μ l	3,00 ng/ μ l
AmpliTaq LD 5 U/ μ l	0,04 U/ μ l

Iniciador *EcoRI* (+1): 5' GACTGCGTACCAATCA 3'

Iniciador *MseI* (+1): 5' GATGAGTCCTGAGTAAA 3'

Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un termociclador PTC-100 (MJ Research) usando el siguiente programa de 30 ciclos:

30 ciclos de:

94°C 30 seg

60°C 30 seg

72°C 60 seg

El producto de la pre-amplificación es usado como templado en el paso final de amplificación.

6.9.3. Amplificación final

Para la amplificación selectiva se emplearon varias combinaciones de iniciadores *EcoRI/MseI* los cuales presentan tres nucleótidos selectivos en 3' (iniciadores +3). Los iniciadores utilizados se detallan a continuación (**Tabla 3**).

La visualización de los productos obtenidos se realizó empleando tinción con nitrato de plata o mediante marcación en 5' del iniciador *EcoRI* con [γ^{32} P] ATP con la enzima T4 polinucleótido kinasa. Mediante el primer método sólo se visualizan los fragmentos de ADN que poseen los extremos del iniciador marcado (bandas *EcoRI/EcoRI* y *EcoRI/MseI*). En el segundo caso, es posible observar todos los fragmentos (bandas *EcoRI/EcoRI*, *EcoRI/MseI* y *MseI/MseI*).

Tabla 3. Iniciadores empleados en la amplificación final de AFLP. Se indica el nombre del iniciador y la secuencia de los nucleótidos selectivos de la región 3'.

Iniciadores EcoRI +3	Sec. de nt selectivos	Iniciadores MseI +3	Sec. de nt selectivos
E 31	AAA	M 31	AAA
E 32	AAC	M 32	AAC
E 38	ACT	M 33	AAG
E 39	AGA	M 34	AAT
E 40	AGC	M 35	ACA
E 41	AGG	M 36	ACC
E 42	AGT	M 37	ACG
E 43	ATA	M 38	ACT
E 44	ATC	M 39	AGA
E 45	ATG	M 40	AGC
E 46	ATT	M 41	AGG
		M 42	AGT
		M 43	ATA
		M 44	ATC
		M 45	ATG

Marcación radioactiva del *primer EcoRI +3*

Para cada reacción de amplificación se marcó el iniciador *EcoRI +3* en un volumen final de 1 μl conteniendo:

Componentes	Concentración final
Buffer T4 kinasa 10X (Gibco, BRL)	0,10X
Iniciador <i>EcoRI</i> (+3) 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	6,70 $\text{ng}/\mu\text{l}$
T4 kinasa 10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (Gibco, BRL)	0,25 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
$[\gamma^{32}\text{P}]$ ATP 1 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$	0,10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$

La reacción se incubó durante 1 hs a 37°C y luego se detuvo por inactivación de la enzima durante 10 min a 80°C.

Las reacciones de amplificación final se llevaron a cabo en un volumen de 23 μl utilizando 3 μl de pre-amplificación como templado:

Componentes	Concentración final
Buffer PCR 10X (Promega)	1X
MgCl_2 50 mM	1,30 mM
dNTP 5 mM	0,17 mM
Iniciador <i>EcoRI</i> (+3) 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	1,00 $\text{ng}/\mu\text{l}$
Iniciador <i>MseI</i> (+3) 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	1,00 $\text{ng}/\mu\text{l}$
$[\gamma^{32}\text{P}]$ ATP Iniciador <i>EcoRI</i> ⁽¹⁾ 0,10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$	4,30 nCi/ μl
Taq ADN polimerasa (Promega) 5 U/ μl	0,13 U/ μl

(1): no se agrega si se utiliza tinción con plata.

Para las reacciones de amplificación se empleó un termociclador TC 480 (Perkin Elmer Cetus) o en uno PTC-100 (MJ Research) usando el siguiente programa de 36 ciclos con *Touch down* (decrecimiento de la temperatura de anillamiento o *annealing* en cada ciclo):

1 ciclo de:	<i>Touch-down</i> 65-56, 8 ciclos de:	27 ciclos de:
94°C 30 seg	Repite el anterior pero la	94°C 30 seg
65°C 30 seg	temperatura de <i>annealing</i>	56°C 30 seg
72°C 1 min.	desciende 1°C en cada ciclo.	72°C 1 min

6.9.4. Separación de los fragmentos de amplificación mediante electroforesis

Luego de la amplificación selectiva, los fragmentos se resolvieron en geles de acrilamida-bisacrilamida 6% con Urea 7M y TBE 1X (Tris-borato 90 mM, EDTA 2 mM, pH 8) durante 3-4 hs a 40 W, sembrando 5 µl de cada muestra, previa mezcla con buffer de carga (formamida 98%, azul de bromofenol 0,01%, xilencianol 0,01%) y desnaturalización a 95°C por 5 min, puestos inmediatamente en hielo.

Posteriormente, en el caso de uso de radioactivo, los geles fueron fijados en etanol/ácido acético (10%/10%) durante 20 min, secados en papel cromatográfico (3 MM Whatman) mediante vacío y expuestos durante 24-48 hs en películas autoradiográficas (BioMax MR, Kodak).

Tinción con nitrato de plata

En el caso de visualización de los fragmentos por tinción con nitrato de plata, se realizó siguiendo las instrucciones del proveedor (SILVER SEQUENCE™ DNA Sequencing System, Promega). Es importante destacar que en este proceso el gel de poliacrilamida se encuentra fijado al vidrio por un tratamiento especial que se le realiza a este último antes del armado del sistema de electroforesis. En todos los pasos y para todas las soluciones es imprescindible el empleo de agua ultrapura. El proceso de tinción consiste en unos pocos pasos. El gel de poliacrilamida se fija en ácido acético 10% para remover los restos de buffer de electroforesis y la urea, y para evitar la difusión de los pequeños productos de amplificación. Luego, el gel se enjuaga con agua para eliminar el ácido acético y la urea junto con el Tris/borato. A continuación, se tiñe el gel en una solución que contiene nitrato de plata 0.1% y formaldehído 0,056% durante 30 min. Posteriormente, se lava rápidamente

con agua para remover el exceso de plata e inmediatamente se revela con una solución alcalina de carbonato de sodio 3% (m/v) con formaldehído 0,056% y tiosulfato de sodio 0,2 mg/ml. Bajo estas condiciones los iones de la plata se reducen a iones metálicos por acción del formaldehído. El revelado de las bandas de ADN se deja evolucionar hasta que se obtiene la coloración y el contraste deseados. La velocidad de la reacción es dependiente de la temperatura, y se detiene por el agregado de ácido acético 10%. Luego de la tinción, los fragmentos de ADN se visualizan directamente en el gel usando un transiluminador de luz blanca para el relevamiento de los resultados.

6.10. Análisis mediante RGAs

Las amplificaciones se realizaron empleando los iniciadores diseñados por Leister y col. (1996) a partir de los genes de resistencia ya clonados (*RPS2* de *A. thaliana* y *N* de *N. tabacum*) mostrados en la **Tabla 4**, o dos de dichos iniciadores (s1 y as1) pero con el agregado de un nucleótido selectivo extra en 3' (s1+A, C, G o T y as1+A, C, G o T).

Tabla 4. (Adaptada de Leister y col. 1996). Secuencia de los péptidos conservados entre los genes *RPS2* de *A. thaliana* y *N* de *N. tabacum*, y de los oligonucleótidos iniciadores deducidos a partir de ésta empleados en la PCR heteróloga.

N-terminal							
Secuencia peptídica	G	G	V	G	K	T	T
Iniciador s1	5'-GGT	GGG	GTT	GGG	AAG	ACA	ACG-3'
Iniciador s2	5'-GGI	GGI	GTI	GGI	AAI	ACI	ACI-3'
C-terminal							
Secuencia peptídica	G	L	P	L	A	L	
Iniciador as1*	5'-CAA	CGC	TAG	TGG	CAA	TCC-3'	
Iniciador as3*	5'-IAG	IGC	IAG	IGG	IAG	ICC-3'	

*Los iniciadores antisentido (as1 y as3) se encuentran escritos en orientación opuesta a la secuencia peptídica. Así, el primer triplete en cada iniciador se corresponde con el último aminoácido (L) en el péptido. I: inosina.

Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen de 25 µl utilizando 100 ng de ADN de individuos y/o *bulks* como templado, conteniendo:

Componentes	Concentración final
Buffer PCR (Promega) 10X	1X
MgCl ₂ 50 mM	2,50 mM
dNTP 5 mM	0,20 mM
Iniciador Sentido (s) 100 ng/µl	4,00 ng/µl
Iniciador Antisentido (as) 100 ng/µl	4,00 ng/µl
Taq ADN polimerasa 10 U/µl (Promega)	0.10 U/µl

Para la amplificación se empleó un termociclador PTC-100 (MJ Research) usando el siguiente programa:

35 ciclos de:
94°C 1 min
48°C 1 min
72°C 1 min

Manipulación de los productos de PCR obtenidos:

Los productos de amplificación se resolvieron mediante electroforesis en geles de agarosa 1%, buffer TAE 1X, 1 hs a 100V y visualizados por tinción con bromuro de etidio 10mg/ml o en geles de acrilamida-bisacrilamida 6% con Urea 7M, buffer TBE 1X, corridos a 40W por 5 hs y visualizados por tinción con plata como se describió anteriormente (6.9.4).

6.11. Análisis mediante AFLP-RGA

Se ensayó la metodología de AFLP-RGA (Hayes y Saghai-Marroof, 2000) en la cual se realiza todo el protocolo de AFLP (6.9) pero en el paso de amplificación final (6.9.3) se emplea el iniciador *EcoRI*(+1) de AFLP con un iniciador de RGA, en lugar de dos iniciadores +3.

De esta forma se analizaron las combinaciones:

EcoRI(+1)/s1+A

EcoRI(+1)/s1+C

EcoRI(+1)/s1+G

EcoRI(+1)/s1+T

EcoRI(+1)/as1+A

EcoRI(+1)/as1+C

EcoRI(+1)/as1+G

EcoRI(+1)/as1+T

La separación de los fragmentos de amplificación obtenidos se realizó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida teñidos con nitrato de plata en las mismas condiciones explicadas anteriormente (6.9.4).

6.12. Transformación de marcadores AFLP y/o RGA en marcadores tipo SCAR

6.12.1. Aislamiento de fragmentos de ADN de geles de poliacrilamida

Se probaron tres métodos diferentes.

Método 1:

La banda de interés se cortó, utilizando un bisturí, directamente a partir del gel de poliacrilamida teñido con plata. Esta banda se empleó directamente como templado en una reacción de PCR de 25 μ l utilizando la combinación de iniciadores apropiada y el perfil de temperaturas de amplificación de AFLP o RGA, de acuerdo al origen de la misma.

Método 2:

La banda de interés se cortó, utilizando un bisturí, directamente a partir del gel de poliacrilamida teñido con plata. La porción de gel se colocó en un tubo cónico de 0,5 ml (Eppendorf), se cubrió con 100 μ l de agua bidestilada y se incubó durante 20 min a temperatura ambiente. A continuación, se descarta el sobrenadante, se agregaron otros 100 μ l de agua bidestilada y se homogeneiza la banda de gel utilizando una punta de pipeta (*tip*). Este homogenato se incubó durante 15 min a 65°C y se dejó durante una noche a temperatura ambiente. Posteriormente, se centrifugó durante 1 min para separar los fragmentos de gel y el sobrenadante obtenido se transfirió a un nuevo tubo. Una alícuota de 5-7,5 μ l se utilizó como templado para re-amplificar el fragmento utilizando la combinación de iniciadores selectivos apropiada y el perfil de temperaturas de amplificación de AFLP o RGA según el caso.

El producto de amplificación obtenido se visualizó primero en un gel de poliacrilamida de las mismas características y bajo las mismas condiciones que para AFLP o RGA. De esta forma se verificó el tamaño y la identidad del producto esperado junto con la presencia o no de bandas contaminantes. Posteriormente, el producto de amplificación se visualizó mediante electroforesis en gel de agarosa 1%, TAE 1X. La banda de ADN se escindió del gel mediante corte con un bisturí y se purificó usando un sistema (*kit*) de purificación comercial siguiendo las instrucciones del proveedor (QIAquick *PCR purification kit*, QIAGEN).

Método 3 (basado en Sambrook y col., 1989):

El fragmento de interés se cortó del gel de poliacrilamida teñido con plata con un bisturí y se colocó en un tubo cónico de 0,5 ml (Eppendorf). Se agregaron 20 μ l de buffer de elución (AcONH₄ 0,5 M y EDTA 1 mM, pH 8,0) y se incubó a 37°C durante una noche

con agitación. Posteriormente, se centrifugó la muestra a 10.000 g por 10 min a 20°C. Se transfirió el sobrenadante a otro tubo, evitando transferir fragmentos de acrilamida. Al pellet se le agregó medio volumen de buffer de elución, se agitó y se centrifugó nuevamente para volver a tomar el sobrenadante. Se combinaron los dos sobrenadantes. Se precipitó el ADN con 2,5 volúmenes de etanol 2 hs a -20°C y se centrifugó 20 min a 10.000g. Se lavó el pellet con etanol 70%, se secó al aire o por vacío y se resuspendió en 10 µl de agua. De esta solución, se tomaron 2,5 µl que se emplearon como templado en una reacción de amplificación por PCR usando los iniciadores específicos (de AFLP o RGA según el caso). Se analizó la obtención del producto esperado en un gel de poliacrilamida como se describió anteriormente para el Método 2.

6.12.2. Clonado de los fragmentos aislados

Se realizó un clonado del fragmento de AFLP o RGA purificado obtenido, en el vector pGEM-T (*pGEM-T Vector*, Promega) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante y usando una relación vector:inserto de 1:3. A continuación se transformaron células competentes químicas DH5α (preparadas en el laboratorio según Sambrook y col., 1989) con 1 µl de la reacción de ligación. Posteriormente, los clones recombinantes se identificaron y seleccionaron según su coloración azul/blanca en un medio X-gal/ IPTG. Los clones positivos se analizaron por digestión con la enzima de restricción *EcoRI* (libera el inserto del vector). Luego, aquellos clones que presentaron un fragmento del tamaño esperado se analizaron mediante PCR con la combinación de iniciadores específicos correspondientes y en las condiciones de PCR antes descriptas según el caso (RGA o AFLP). Posteriormente, los clones de interés se secuenciaron.

6.12.3. Secuenciación de fragmentos clonados

La reacción de secuenciación del fragmento clonado se llevó a cabo utilizando secuenciación manual o por secuenciación automática (Unidad de Genómica, IB-INTA o Macrogen, Corea).

En el caso de secuenciación manual, se empleó un sistema (*kit*) de secuenciación por PCR (*fmol*® Sequencing System, Promega), basado en el método de Sanger y col. (1977), mediante incorporación de [α -³⁵S]dATP. Los productos de reacción se visualizaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante (acrilamida-bisacrilamida

6%, 7M Urea y TBE 1X), secado sobre un papel cromatográfico (3MM Whatman paper) y expuesto por 48 hs sobre una película autorradiográfica (BioMax MR, Kodak).

6.12.4. Condiciones de amplificación del marcador RGA(584) como un marcador SCAR

Se emplearon 100 ng de ADN como templado en reacciones de PCR empleando iniciadores específicos diseñados para este marcador.

Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen de 25 µl conteniendo:

Componentes	Concentración final
Buffer PCR 10X (Promega)	1X
MgCl ₂ 50 mM	1,50 mM
dNTP 5 mM	0,20 mM
Iniciador 584F 100 ng/µl	4,00 ng/µl
Iniciador 584R 100 ng/µl	4,00 ng/µl
Taq ADN polimerasa 10 U/µl	0,10 U/µl

Iniciador 584F: 5'GGGACAAGGGAAAACGACAA 3'

Iniciador 584R: 5' CAACGCTAGTGGCAATCCTT 3'

Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un termociclador PTC-100 (MJ Research) usando el siguiente programa de 35 ciclos:

1 ciclo de: 94°C 3 min	35 ciclos de: 94°C 1 min 57°C 45 seg 72°C 1 min	1 ciclo de: 72°C 3 min
----------------------------------	---	----------------------------------

Los productos de amplificación se resolvieron mediante electroforesis en geles de agarosa 1%, TAE 1X y visualizados por tinción con bromuro de etidio 10mg/ml.

6.13. Análisis mediante RFLP

6.13.1. Restricción, electroforesis y transferencia

El ADN genómico de interés en una cantidad de 5 a 10 µg, se digirió con 3-4 U/µg de ADN de enzima de restricción (según corresponda) *HindIII*, *XhoI*, *EcoRI*, *EcoRV*, *XbaI*, *DraI*, *BamHI*, *Hinfl*, *DdeI* o *StyI* (New England Biolabs), por 4 hs de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Los productos de digestión se separaron por tamaño mediante

electroforesis en gel de agarosa 0,8%, TAE 1X a 0,6 mA/cm. Posteriormente se realizó la transferencia del ADN digerido a una membrana de nylon (*Amersham Hybond N+*, General Electric) empleando SSC 6X y mediante la metodología de *Southern Blotting* (Southern, 1975), previa desnaturalización del gel con 0,25 M HCl (Sambrook y col., 1989). La membrana obtenida se lavó con SSC 2X y se secó a 80°C por 20 min. El ADN se unió covalentemente a la membrana mediante irradiación con luz UV (0,12 J/cm²).

6.13.2. Marcación de la sonda, hibridación y autorradiografía

Las membranas obtenidas se hibridaron con distintas sondas según lo requerido. Las sondas se marcaron radioactivamente con [$\gamma^{32}\text{P}$]dCTP mediante el método de *random primer* (iniciado al azar) de Feinberg y Vogelstein (1983, 1984) empleando reactivos comerciales (*Prime-a-Gene Labeling System*, Promega) y siguiendo las instrucciones del proveedor.

Se emplearon las sondas provenientes del mapa de referencia de papa (Gebhardt y col., 1991) ligadas a genes de resistencia a Rx conocidos (Ritter y col., 1991). Estas sondas fueron: GP21 (de cromosoma V), GP34, CP60, CP66, (de cromosoma XII), las cuales fueron cedidas por la Dra. C. Gebhardt, *Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung*, Köln, Alemania). También se empleó la sonda RGA(584) proveniente de *S. commersonii*, originada a partir de este trabajo (ver 6.12).

Para las reacciones de prehibridación y la hibridación se utilizó solución de PAES (ácido polianetolsulfónico) compuesta por PAES 0,2%, SSC 5X, SDS 0,02% y lauril-sarcosina 0,01%; colocando la membrana en tubos de vidrio con tapa plástica siliconada. Los tubos se incubaron en un horno a 65°C, con agitación durante toda la noche, tanto para la prehibridación como para la hibridación.

Los lavados posteriores a la hibridación se realizaron en la botella según el siguiente esquema básico:

Primer lavado: 100 ml SSC 2X, SDS 0,5%, 65°C, 20min

Segundo lavado: 100 ml SSC 1X, SDS 0,5%, 65°C, 20 min

Tercer lavado: 100 ml SSC 0,5X, SDS 0,5%, 65°C, 10 min

Cuarto lavado: 100 ml SSC 0,1X, SDS 0,1%, 65°C, 20min

Este esquema de lavados se modificó levemente de acuerdo con la señal radiactiva registrada y el tipo de sonda empleada (homóloga o heteróloga, en *S. commersonii* o en *S. lycopersicum* y *S. pennellii*).

La membrana así tratada se expuso a una placa autoradiográfica (Kodak X-OMAT AR5) con intensificador a -70°C durante 4-7 días o se analizó mediante el empleo de un escáner de emisiones radiactivas (Typhoon TRIO, *Variable Mode Imager*, General Electric). Este sistema emplea unas pantallas especiales (*Storage Phosphor Screens*) que retienen la energía de las partículas beta, rayos gamma y rayos X, y requiere tiempos de exposición que son 50-90% menores que las placas autoradiográficas convencionales. Durante el análisis por barrido del escáner, luego de la estimulación inducida por un láser, la luz es emitida por la pantalla proporcionalmente a la cantidad de radiactividad presente en la muestra. La imagen digital resultante se analiza de manera convencional.

6.14. Análisis mediante SSR

Las reacciones de amplificación de microsátélites se llevaron a cabo en base a la información disponible en la literatura (Milbourne y col., 1998; Marcucci Poltri, 1998).

Se emplearon 10 ng de ADN genómico como templado y los iniciadores que se muestran a continuación (**Tabla 5**).

Tabla 5. Marcadores microsátélites de *S. tuberosum* empleados en este trabajo. En la tabla se indican el nombre del marcador, la repetición del microsátélite, las secuencias de los iniciadores correspondientes para la amplificación de cada *locus* con las temperaturas de *melting* (T_m), el tamaño del producto esperado y su localización cromosómica.

Nombre	Repetición	Secuencia de los iniciadores (5'-3')	T_m ($^{\circ}\text{C}$)	Tamaño esperado del producto (pb)	Localización (grupo de ligamiento)
STM1008	(AT)10	F: GTACACAGCAAAATAGCAAG R: TAGACACTCTCACATCCACT	56,0 56,0	140	II, IV, IX
STM1021	(C)17...(CT)8 (AT)9	F: GGAGTCAAAGTTTGCTCACATC R: CACCCTCAACCCCATATC	58,8 60	181	IX
STM1029	(C)12	F:AGGTTCACTCACAATCAAAGCA R:AAGATTTCCAAGAAATTTGAGGG	59,8 59,8	165	I

F: *Forward*, Iniciador sentido, R: *Reverse*, Iniciador antisentido.

Las reacciones de amplificación se realizaron con los siguientes componentes en un volumen final de 10 μ l:

Componentes	Concentración final
Buffer PCR 10X (Invitrogen)	1X
MgCl ₂ 50 mM	2,0 mM
dNTP 5 mM	0,20 mM
Iniciador sentido (F) 100 ng/ μ l	4,00 ng/ μ l
Iniciador antisentido (R) 100 ng/ μ l	4,00 ng/ μ l
Taq ADN polimerasa 10 U/ μ l (Invitrogen)	0.10 U/ μ l

Las amplificaciones se llevaron a cabo en un termociclador PTC-100 (MJ Research) usando el siguiente programa:

35 ciclos de:

94°C	1 min
T _m específica de los iniciadores empleados	1 min
72°C	1 min

Los productos de amplificación se resolvieron en geles de agarosa de alta resolución 2% (MetaPhor, FMC), buffer TAE 1X, teñidos con bromuro de etidio 10mg/ml o en geles de acrilamida-bisacrilamida 6% Urea 7M, buffer TBE 1X, corridos a 40W por 2 hs y visualizados por tinción con plata como se describió en el punto 6.9.4.

6.15. Análisis de marcadores (SCAR, CAPS, EST) disponibles a partir de la literatura

A partir de la consulta bibliográfica o de bases de datos de internet, se seleccionaron otros marcadores de tipo SCAR, CAPS y EST a partir de diferentes especies de solanáceas, potencialmente útiles para el mapeo del gen de interés.

En el análisis se empleó como fuente de ADN a los *bulks* de *S. commersonni* y/o los parentales de las ILs de tomate. Las modificaciones críticas a los protocolos descritos en cada cita para la obtención de los marcadores se describen en la tabla a continuación (**Tabla 6**).

Tabla 6. Marcadores seleccionados a partir de diferentes especies de solanáceas, tomados de diferentes fuentes (bibliografía, internet). Se indica el nombre, localización cromosómica (Cr.) y tipo del marcador; la fuente de procedencia del mismo, la especie de donde fue aislado o caracterizado, las condiciones de PCR y digestión con enzimas de restricción (en el caso que corresponda) y la forma de visualización.

Marcador	Cr.	Tipo	Referencia	Especie	Condiciones PCR	Digestión con enzima de restricción	Visualización
SPUD237	V	CAPS	De Jong y col. (1997)	<i>S. tuberosum</i>	Mg 2,5 mM Annealing: 55°C	<i>AluI</i>	Electroforesis en agarosa 2%, TAE 1X
GP21	V	CAPS	De Jong y col. (1997)	<i>S. tuberosum</i>	Mg 2,5 mM Annealing: 55°C	<i>AluI</i>	Electroforesis en agarosa 2%, TAE 1X
E325111	IX	CAPS	Smilde y col. (2005)	<i>S. mochiquense</i>	Mg 3 mM Annealing: 50°C	<i>AluI</i>	Electroforesis en agarosa 1,5%, TAE 1X
CP110	IX	CAPS	Smilde y col. (2005)	<i>S. mochiquense</i>	No amplificable		
Sw5m	IX	CAPS	Smilde y col. (2005)	<i>S. mochiquense</i>	No amplificable		
T156	IX	CAPS	Smilde y col. (2005)	<i>S. mochiquense</i>	Mg 3 mM Annealing: 50°C	<i>RsaI</i>	
TG328	IX	CAPS	Smilde y col. (2005)	<i>S. mochiquense</i>	Mg 3 mM Annealing: 50°C	<i>AluI</i>	
SC878(885)	IX	SCAR	Marczewski y col. (2006)	<i>S. gourlayi</i>	Mg 3 mM Annealing: 58°C	No corresponde	Electroforesis en agarosa 1,5%, TAE 1X
GP101	IX	SCAR	GenBank (AJ487147)	<i>S. tuberosum</i>	Mg 1,5 mM Annealing: 58°C	No corresponde	Electroforesis en agarosa 1,5%, TAE 1X
S1d11	IX	EST	Sliwka y col. (2006)	<i>S. phureja</i>	Mg 1,5 mM Annealing: 56°C	No corresponde	Electroforesis en agarosa 1%, TAE 1X
CT220	IX	SCAR	www.sgn.cornell.edu y Folkertsma y col. (1999)	<i>S. lycopersicum</i>	Mg 3 mM Annealing: 56°C	Se evaluó <i>MseI</i> y <i>AseI</i>	Electroforesis en agarosa 1%, TAE 1X o en poliacrilamida 6%, Urea 7M. TBE 1X
4-6JRB	IX	SCAR	Folkertsma y col. (1999)	<i>S. lycopersicum</i>	No amplificable		
Sw5	IX	SCAR	Garland y col. (2005)	<i>S. lycopersicum</i>	Mg 9 mM Annealing: 56°C		Electroforesis en agarosa 1%, TAE 1X

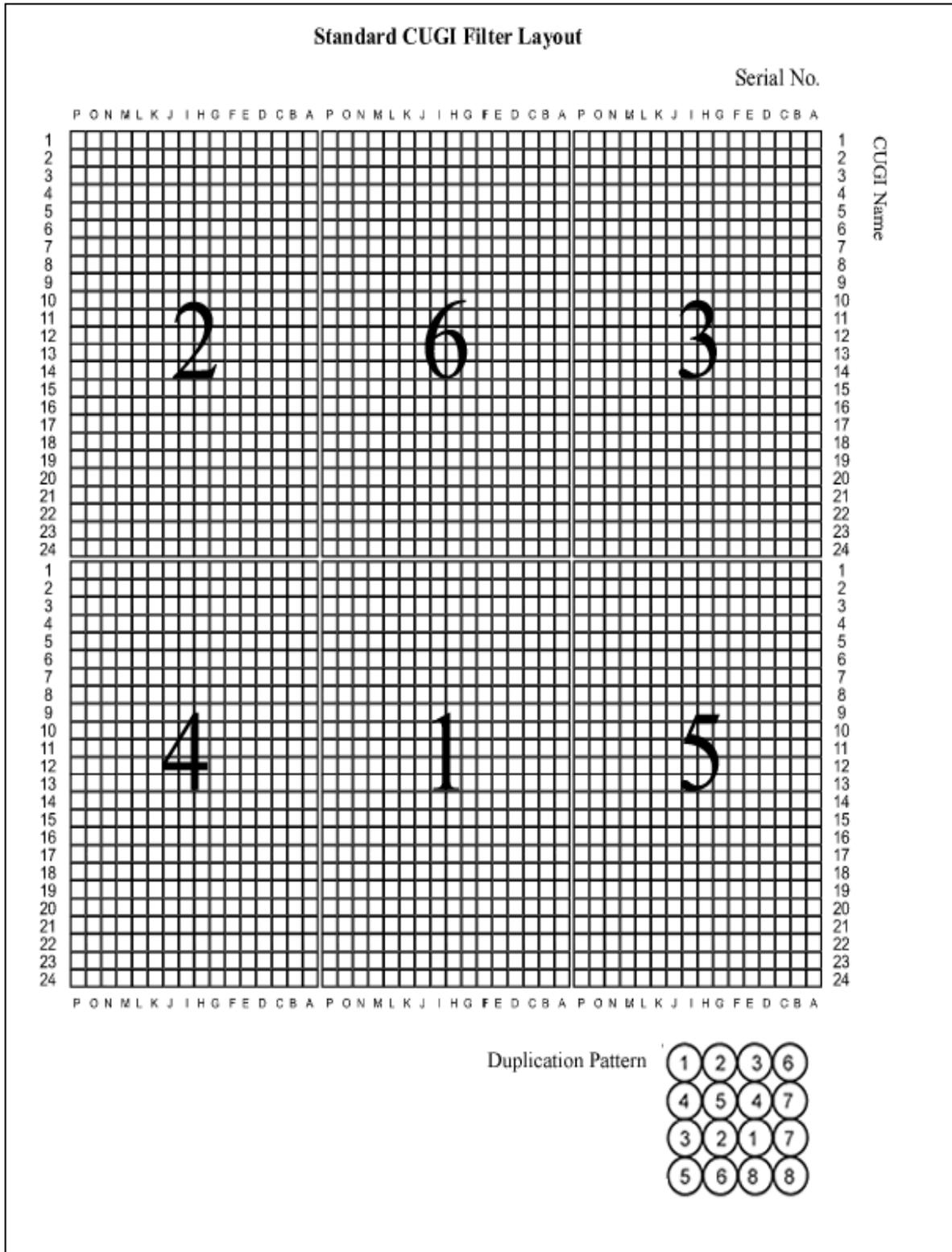
6.16. Análisis de una genoteca de BACs de *S. bulbocastanum*

Se empleó una genoteca de BACs de *S. bulbocastanum* (especie silvestre diploide de papa originaria de México y Guatemala) cultivar PT29 (*BAC library, SB_PBa, Potato*) disponible comercialmente a través de internet, accediendo por los sitios de las instituciones (AGI, *Arizona Genomics Institute* <http://www.genome.arizona.edu/> y CUGI, *Clemson University Genomics Institute* <http://www.genome.clemson.edu/>). Esta genoteca fue generada por el grupo del Dr. Jiming Jiang de la Universidad de Wisconsin, EUA. El ADN de alto peso molecular fue digerido parcialmente con la enzima *HindIII* y clonado en el vector pBeloBAC11 (marcador de selección: cloranfenicol) (Song y col., 2000). La genoteca está compuesta por un total de 18.432 clones (48 placas de 384 pocillos; representados en un único filtro), con un tamaño promedio de inserto de 155 kpb, con una cobertura del genoma de 3,57X (tamaño estimado del genoma: 800 Mpb).

Se realizaron dos copias de la genoteca en placas de 384 que fueron criopreservadas a una temperatura de -80°C.

6.16.1. Análisis de la genoteca con el marcador RGA(584) empleado como sonda

El primer análisis de la genoteca se realizó por hibridación del filtro de nylon de alta densidad que contiene la impronta de todos los clones en un arreglo diagonal por duplicado (**Esquema 1**). Se empleó el marcador RGA(584) como sonda marcada radiactivamente, hibridación a 65°C y posteriores lavados (en condiciones de reducida astringencia debido al uso de una sonda heteróloga) y exposición a placa autoradiográfica, de forma similar a como se describió en el apartado 6.13.2.



Esquema 1. Representación esquemática del filtro de alta densidad de clones de la genoteca de BACs de *S. bulbocastanum*. Los 18.432 clones están distribuidos en 6 campos (número de mayor tamaño, 1 a 6), cada campo está formado por 384 cuadrados. En cada uno de esos cuadrados se ubican 8 clones diferentes por duplicado y en un arreglo diagonal único que permite su identificación (Duplication Pattern). Tomado de *CUGI Protocols* (www.genome.clemson.edu/protocols.shtml).

6.16.2. Purificación y caracterización de clones de interés de la genoteca

Se identificaron los clones positivos de interés a partir del análisis anterior, mediante el empleo de una grilla de identificación de los clones en el filtro (**Esquema 1**) según se describe en CUGI *Protocols* (www.genome.clemson.edu/protocols.shtml).

El aislamiento del ADN de los clones de interés se realizó por la técnica de minipreparación de ADN plasmídico a partir de cultivos líquidos con medio LB (Tryptona 10 g/l, Extracto de levadura 5 g/l, NaCl 10 g/l, pH 7,0) conteniendo cloranfenicol (12 µg/ml) como antibiótico selectivo, crecidos por 36 hs a 37°C y según se describe en Birren y col. (1999).

Se emplearon 20 ng del ADN de los clones de BACs como templado en reacciones de PCR empleando iniciadores específicos para este marcador.

Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen de 25 µl conteniendo:

Componentes	Concentración final
Buffer PCR 10X (Promega)	1X
MgCl ₂ 50 mM	2,50 mM
dNTP 5 mM	0,20 mM
Iniciador 584F 100 ng/µl	4,00 ng/µl
Iniciador 584R 100 ng/µl	4,00 ng/µl
Taq ADN polimerasa 10 U/µl	0,10 U/µl

Iniciador 584F: 5' GGGACAAGGGAAAACGACAA 3'

Iniciador 584R: 5' CAACGCTAGTGGCAATCCTT 3'

Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un termociclador PTC-100 (MJ Research) usando el siguiente programa de 40 ciclos con *Touch down* (decrecimiento de la temperatura de anillamiento o *annealing* en cada ciclo):

1 ciclo de:	Touch-down 62-55, 6 ciclos de:	33 ciclos de:
94°C 1 mn	Repite el anterior pero la	94°C 1 min
62°C 45 seg	temperatura de <i>annealing</i>	55°C 45 seg
72°C 1 min.	desciende 1°C en cada ciclo.	72°C 1 min

Los productos de amplificación se resolvieron mediante electroforesis en geles de agarosa 1%, TAE 1X, 2 hs a 100V y visualizados por tinción con bromuro de etidio 10mg/ml. La banda de ADN de interés se escindió del gel mediante corte con un bisturí y se purificó el ADN usando un sistema (*kit*) de purificación (QIAquick *PCR purification kit*, QIAGEN). El ADN del fragmento obtenido se envió a secuenciar con uno de los iniciadores

específicos empleando un servicio de secuenciación automática (Unidad de Genómica, IB-INTA o Macrogen, Corea).

Para la caracterización del tamaño de inserto de los clones, éstos se digirieron con la enzima *NotI* siguiendo el protocolo descrito por Birren y col. (1999) y se resolvieron mediante electroforesis en campo pulsado (PFGE: *Pulse Field Gel Electrophoresis*) con el sistema CHEF DRII (BioRad). Los fragmentos de ADN en el sistema CHEF (*Contour clamped Homogeneous Electric Field*) son sometidos a campos eléctricos alternados donde el ángulo entre los dos campos es de 120°. El principio de separación está basado en la velocidad diferencial de reorientación de las moléculas en el momento de la alternancia de los dos campos eléctricos. Esta velocidad de reorientación es proporcional al tamaño de los fragmentos de ADN.

Las condiciones de electroforesis para visualizar fragmentos de alto peso molecular fueron: agarosa 1%, TBE 0,5X, 12°C, 120° de ángulo, voltaje de 6 V/cm, con un pulso inicial de 5 seg y un pulso final de 15 seg, durante 14 hs. La visualización del gel se realizó mediante tinción con bromuro de etidio 10 mg/ml, empleo de un transiluminador de luz UV y fotografía utilizando un sistema de foto-documentación (Fotodyne).

Para la detección de clones repetidos (*fingerprinting*), se realizó la caracterización de los mismos mediante digestión con la enzima de restricción *HindIII* (Birren y col., 1999), electroforesis en gel de agarosa 0,8 %, TAE 1X, 5 V/cm durante 16 hs y posterior transferencia del gel por el método descrito anteriormente (6.13.1.). La membrana obtenida se hibridó con la sonda del marcador RGA(584) como se describió en 6.13.2.

6.17. Amplificación de homólogos a genes *Rx*

El aislamiento de secuencias homólogas a *Rx* ya clonados se realizó siguiendo la estrategia descrita en Bendahmane y col. (2000).

Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen de 25 µl, empleando 200 ng de ADN como templado y conteniendo:

Componentes	Concentración final
Buffer PCR 10X (Invitrogen)	1X
MgCl ₂ 50 mM	3,00 mM
dNTP 5 mM	0,20 mM
Iniciador P-R1 100 ng/µl	4,00 ng/µl
Iniciador T-R2 100 ng/µl	4,00 ng/µl
Platinum Taq ADN polimerasa 10 U/µl	0,10 U/µl

Iniciador P-R1: 5' GGCAATTTGTTTCATCTAGATACTGAGAGA 3'

Iniciador T-R2: 5' TATTCAGAGCTCTGGCTAGTCCTCAGAACACC 3'

Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un termociclador PTC-100 (MJ Research) usando el siguiente programa de 36 ciclos con incremento de la temperatura de anillamiento o *annealing* en cada ciclo:

5 ciclos de:	<i>Touch-down</i> 45-50, 11 ciclos de:	20 ciclos de:
94°C 30 seg	Repite el anterior pero la	94°C 30 seg
45°C 15 seg	temperatura de <i>annealing</i>	52°C 15 seg
72°C 3 min.	asciende 0,5°C en cada ciclo.	72°C 3 min

Los productos de amplificación se resolvieron mediante electroforesis en geles de agarosa 1%, TAE 1X, 2 hs a 100 V/cm y visualizados por tinción con bromuro de etidio 10 mg/ml. La banda de ADN de interés se escindió del gel mediante corte con un bisturí y se purificó el ADN usando un sistema (*kit*) de purificación (QIAquick *PCR purification kit*, QIAGEN). El fragmento puro se clonó de forma similar a como se indica en 6.12.2. y se realizó la secuenciación mediante el empleo de un servicio de secuenciación automática (Unidad de Genómica, IB-INTA o Macrogen, Corea).

6.18. Análisis estadístico y bioinformático de los datos

6.18.1. Análisis de ligamiento

El estado homo o heterocigota de los parentales se infirió a partir del análisis de segregación del carácter, realizando una prueba de χ^2 de bondad de ajuste a las proporciones esperadas.

El análisis de ligamiento y el cálculo de las frecuencias de recombinación se computaron de acuerdo con Bailey (1961) como se explica a continuación.

Se evaluó la presencia o ausencia del marcador molecular en estudio para cada uno de los genotipos de las distintas poblaciones. Se analizaron sólo las bandas claramente visibles y los casos dudosos se excluyeron en el procesamiento posterior de los datos. La resistencia se trató como otro marcador segregante simple, estando presente en los individuos resistentes y ausente en los susceptibles.

Para comprobar que los valores observados correspondían o no a un fenómeno de ligamiento entre el marcador y el carácter, se realizó la prueba de χ^2 , sobre los datos de la matriz de genotipos obtenida, considerando que los caracteres segregan de manera independiente (es decir, ajuste a la proporción 1:1:1:1).

Posteriormente, para probar si cada par de alelos del marcador (presencia(1)/ausencia(0)) y del carácter (resistencia(R)/susceptibilidad(S)) se comportaban correctamente desde el punto de vista de segregación genética mendeliana, se realizaron sendas pruebas de χ^2 para la segregación en los *loci* 1,0 y R,S.

Luego se calculó la frecuencia de recombinación (RF) entre el marcador y el gen de resistencia, realizando el cociente entre el número de individuos recombinantes y el total de individuos analizados.

Se utilizó el programa MAPMAKER/EXP v. 3.0 (Lander y col., 1987), para calcular la distancia genética entre el marcador y el carácter, y para la obtención de un mapa de ligamiento de los marcadores y el gen de resistencia, con un valor de $LOD \geq 3$. Las distancias genéticas se estimaron empleando la función de mapa de Kosambi (Kosambi, 1944). Esta función no sólo considera los posibles dobles entrecruzamientos sino que también tiene en cuenta el fenómeno de interferencia y es la comúnmente usada para la construcción de mapas de ligamiento de marcadores moleculares.

6.18.2. Análisis de secuencias nucleotídicas

Análisis de secuencias: edición y alineamiento

El análisis, la edición y la superposición de las secuencias se realizó empleando el programa BioEdit® (Tom Hall, <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>) disponible públicamente.

Análisis comparativo: similitud y homología

Las secuencias se compararon contra bases de datos internacionales de nucleótidos vía internet usando los algoritmos BLAST2 (*Basic Local Alignment Search Tool*, Altschul y col., 1990) y/o FASTA (*FastA*, Lipman y Pearson, 1985 y 1988). Los parámetros utilizados para los análisis fueron aquellos que los portales de acceso utilizan por defecto. Las bases de datos de secuencias (*Nucleotide Sequence Databases*) internacionales (de Europa, EUA y Japón) consultadas fueron:

EMBL-EBI, *European Molecular Biology Laboratory-European Bioinformatics Institute*, <http://www.ebi.ac.uk/>

GenBank del NCBI, *Nacional Center for Biotechnology Information*,

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

DDBJ, *DNA Data Bank of Japan*, del CIB-DDBJ/NIG *Center for Information Biology and DNA Data Bank of Japan/ National Institute of Genetics* <http://www.ddbj.nig.ac.jp/>

Análisis y construcción de secuencias ensambladas (*contigs*)

El ensamblado de secuencias y la formación de secuencias consenso se realizó empleando el programa CAP3 (Huang y Madan, 1999) disponible a través de internet utilizando los parámetros que se presentan por defecto (<http://genome.cs.mtu.edu/cap/cap3.html>). El alineamiento múltiple de secuencias se realizó empleando el programa ClustalW (Thompson y col., 1994) disponible por la misma vía (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw>).

Análisis de secuencias: envío de secuencias a bases de datos

El envío de información de secuencias para su almacenamiento y disponibilidad pública en las bases de datos internacionales se realizó siguiendo las indicaciones descritas en dichas bases, obteniendo un número de acceso de la secuencia enviada. En particular, la secuencia generada se depositó en la base de datos GenBank (*Submission of sequence information*, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>).

Análisis de sitios de restricción y diseño de iniciadores de PCR específicos para secuencias de interés.

El análisis de la presencia de sitios restricción en las secuencias se realizó empleando el programa NEBcutter V2.0 (Vincze y col. 2003) disponible públicamente en internet (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php>).

El diseño de iniciadores específicos para reacciones de PCR a partir de secuencias se realizó empleando el programa Primer3 (Rozen y Skaletsky, 2000) accesible por la misma vía (http://www.embnet.sk/cgi-bin/primer3_www.cgi) y utilizando los parámetros por defecto.

Otras bases de datos consultadas:

Se consultaron bases de datos específicas de la familia *Solanaceae*, ya sea para la

comparación de secuencias como para la búsqueda de marcadores en mapas de ligamiento públicos y en bases de datos. Estas fueron:

PoMaMo Database -Potato Maps and More: <http://gabi.rzpd.de/projects/Pomamo/>

Solanaceae Genomics Network: <http://sgn.cornell.edu/>

NSF Potato Genome Project: http://www.potatogenome.org/nsf5/databases_resources/

Potato Simple Sequence Repeats (SSR), Query the Potato Simple Sequence Repeat DB:
http://www.tigr.org/tdb/potato/SSR/query_potato.shtml

Catálogo online de marcadores AFLP que cubren el genoma de papa:

<https://cbsgdbase.wur.nl/UHD/>

(anteriormente: <http://www.spg.wau.nl/pv/aflp/catalog.htm>)

Mapa Ultradenso de papa, *Ultra High Density Map*: <https://cbsgdbase.wur.nl/UHD/>

(anteriormente: <http://potatodatabase.dpw.wau.nl/UHDdata.html>)

TIGR Plant Gene Index: <http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/plant.html>

TIGR Solanaceae Genomics Resource: <http://www.tigr.org/tdb/sol/>

Solanaceae Disease Resistance (SOLAR) Gene Database:

http://www.tigr.org/tdb/potato/disease_db/candidates.shtml

Potato Genome Sequencing Consortium: <http://potatogenome.net>

7. RESULTADOS

7.1. Evaluación fenotípica de las poblaciones por su resistencia a la infección con PVX MS

Se analizaron tres poblaciones de *S. commersonii*, obtenidas a partir de cruzamientos entre un genotipo resistente y tres genotipos susceptibles, procedentes de la EEA INTA-Balcarce. El análisis fenotípico consistió en determinar mediante la técnica de ELISA el grado de infección de las plantas inoculadas con PVX MS.

Se infectaron un mínimo de 3 y un máximo de 5 plantas por genotipo. En los mismos ensayos se incluyeron plantas susceptibles control del cultivar *Huinkul* MAG (que no porta genes de resistencia a PVX conocidos). Las concentraciones de virus alcanzadas por los individuos susceptibles fueron muy diferentes a las mostradas por los resistentes, permitiendo una determinación certera del fenotipo. Los valores para los individuos resistentes se mantuvieron en un rango de entre 10 y 40 ng de PVX/pocillo mientras que los correspondientes a los individuos susceptibles estuvieron entre 1.000 y 3.000 ng de PVX/pocillo, coincidiendo con los resultados obtenidos para los controles susceptibles. Un genotipo se consideró susceptible, si en al menos uno de sus clones ensayados se detectaba virus en concentración semejante al control *Huinkul* MAG (para más detalles ver Martínez, 1997).

El análisis de la progenie de los tres cruzamientos, mostró una segregación que ajusta a una proporción fenotípica 1R:1S para el carácter resistencia extrema a PVX MS (**Tabla 7**).

Tabla 7: Proporción fenotípica observada de las tres poblaciones. Se indican los parentales de cada cruzamiento de acuerdo con la denominación de INTA-Balcarce.

Población	Progenitores		Progenie		χ^2 1R:1S
	Resistente	Susceptible	Resistente	Susceptible	
78	B8R-5138	B7F-5138	26	24	0,04 (p>0,05)
93	B8R-5138	19.5138	19	32	2,40 (p>0,05)
1007	B8R-5138	6.5138	8	8	0,00 (p>0,05)

Estos resultados indican que la resistencia extrema a PVX MS presente en *S. commersonii* está dada por un gen único y dominante. De acuerdo con la nomenclatura propuesta por Valkonen (1996), a este gen se lo denominó Rx_{cmm} .

El análisis fenotípico muestra que el gen Rx_{cmm} estaría presente en estado heterocigota en el parental resistente compartido por las tres poblaciones y pone de manifiesto la existencia de dos clases genotípicas en la progenie de los cruzamientos: resistente heterocigota (Rr) y susceptible homocigota (rr).

7.2. Análisis de segregación en mezclas de ADN (BSA: *Bulked Segregant Analysis*)

Para identificar marcadores específicamente ligados al alelo de resistencia, se utilizó la estrategia de análisis de grupos de segregantes o análisis de segregantes agrupados (BSA: *bulked segregant analysis*) descrita por Michelmore y col. (1991) y Giovannoni y col. (1991).

En este trabajo se utilizó la técnica de BSA para buscar marcadores ligados al gen Rx_{cmm} utilizando distintas técnicas de marcadores moleculares, generando así pares de *bulks* de ADN de individuos resistentes y susceptibles a PVX. Dentro de cada grupo o *bulk* de ADN, los individuos serán idénticos para la región genómica alrededor del gen de resistencia extrema (Rx) a PVX MS, pero diferentes para el resto de los *loci* del genoma. Al realizarse la mezcla de ADN de diferentes individuos, se homogeneiza el fondo genético que finalmente será semejante para ambos grupos. Por este motivo, los marcadores que aparezcan como polimórficos entre los dos grupos estarán generalmente ligados al gen Rx_{cmm} responsable del carácter resistencia extrema a la infección por PVX MS. Posteriormente, se debe confirmar en la población segregante que existe ligamiento entre el marcador obtenido por esta técnica y el gen Rx estudiado.

Los datos fenotípicos obtenidos se emplearon para la construcción de las distintas mezclas de ADN (*bulks*) a partir de individuos de la población 78. El análisis fenotípico realizado muestra que los *bulks* resistentes estarían compuestos por individuos heterocigotas para el gen de resistencia y los *bulks* susceptibles por individuos homocigotas. En estas condiciones, debido a que la región del ADN homóloga al Rx del parental susceptible está también presente en el *pool* resistente, se espera que sólo los marcadores ligados en *cis* con el gen de resistencia puedan ser identificados en el presente trabajo.

El número de genotipos incluido en cada *bulk* fue estudiado y definido para las metodologías de RAPD y AFLP en un trabajo anterior del cual esta tesis es continuación (Martinez, 1997).

Debe recordarse que para encontrar marcadores ligados por este método, los *bulks* no deben estar formados por pocos individuos (porque implicaría la detección de un gran

número de marcadores falsos positivos debido al azar), ni de demasiados individuos (porque la sensibilidad de detección del ADN procedente de un único individuo se vuelve limitante y porque la “ventana” de ligamiento alrededor del *locus* que se desea mapear se vuelve muy pequeña, reduciendo la probabilidad de encontrar marcadores ligados) (Michelmore y col., 1991). La optimización de estos parámetros difiere según la técnica de marcadores moleculares utilizada, entre otras variables. Estos aspectos fueron abordados en el trabajo previo (Martínez, 1997).

El análisis de RAPD se realizó con la mezcla de ADN de 11 individuos resistentes (*bulk* B2R) y 10 individuos susceptibles (*bulk* B2S) a PVX MS, mezcladas en cantidades equimolares. Para AFLP se utilizó el ADN mezclado de 24 individuos resistentes (*bulk* B3R) y 21 individuos susceptibles (*bulk* B3S) al PVX MS, mezclados también en cantidades equimolares.

Para las demás metodologías de marcadores moleculares (RFLP, CAPS, SCAR, SSR), se emplearon los *bulks* B2R y B2S o B1R y B1S (de 7 individuos resistentes y 5 susceptibles al PVX MS, respectivamente, mezclando cantidades equimolares de ADN) de acuerdo con el nivel de detección de polimorfismo buscado. En ese sentido, el empleo de los *bulks* de menor número de individuos implica la obtención de una mayor cantidad de polimorfismos que pueden no estar asociados al carácter en estudio (falsos positivos) (Martínez, 1997).

Los *bulks* B3R y B3S incluyen los individuos de los *bulks* B2R y B2S y estos últimos incluyen los individuos de los *bulks* B1R y B1S correspondiendo todos a la población 78 de *S. commersonii*.

En el análisis con las distintas metodologías de marcadores, debido a que se careció de los individuos parentales de los cruzamientos, éstos no pudieron ser analizados junto con los *bulks*.

7.3. Análisis de segregantes agrupados (BSA) empleando marcadores ligados a otros genes de resistencia a PVX ya mapeados.

Con la información disponible de otros genes de resistencia a PVX ya localizados cromosómicamente, se decidió emplear marcadores ligados a los mismos para determinar si *Rx_{cmm}* colocalizaba con alguno de dichos genes siendo, potencialmente, un alelo de éstos. A partir de los genes de resistencia extrema *Rx1* y *Rx2* localizados en cromosoma XII y V respectivamente (Ritter y col., 1991), se analizaron marcadores de tipo RFLP mediante el empleo de las sondas GP21 (cromosoma V), GP34, CP60, CP66, (cromosoma XII) cedidas

por la Dra. C. Gebhardt, *Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung*, Köln, Alemania). Estas sondas se hibridaron sobre el ADN de los *bulks* B2R y B2S (11 y 10 individuos, respectivamente) digerido con 10 enzimas de restricción (*XhoI*, *HinfI*, *DdeI*, *HindIII*, *DraI*, *EcoRI*, *StyI*, *EcoRV* y *BamHI*). El análisis con estos marcadores RFLP ligados a los genes de resistencia extrema *Rx1* y *Rx2* resultaron monomórficos entre los *bulks* resistente y susceptible (**Figura 9**).

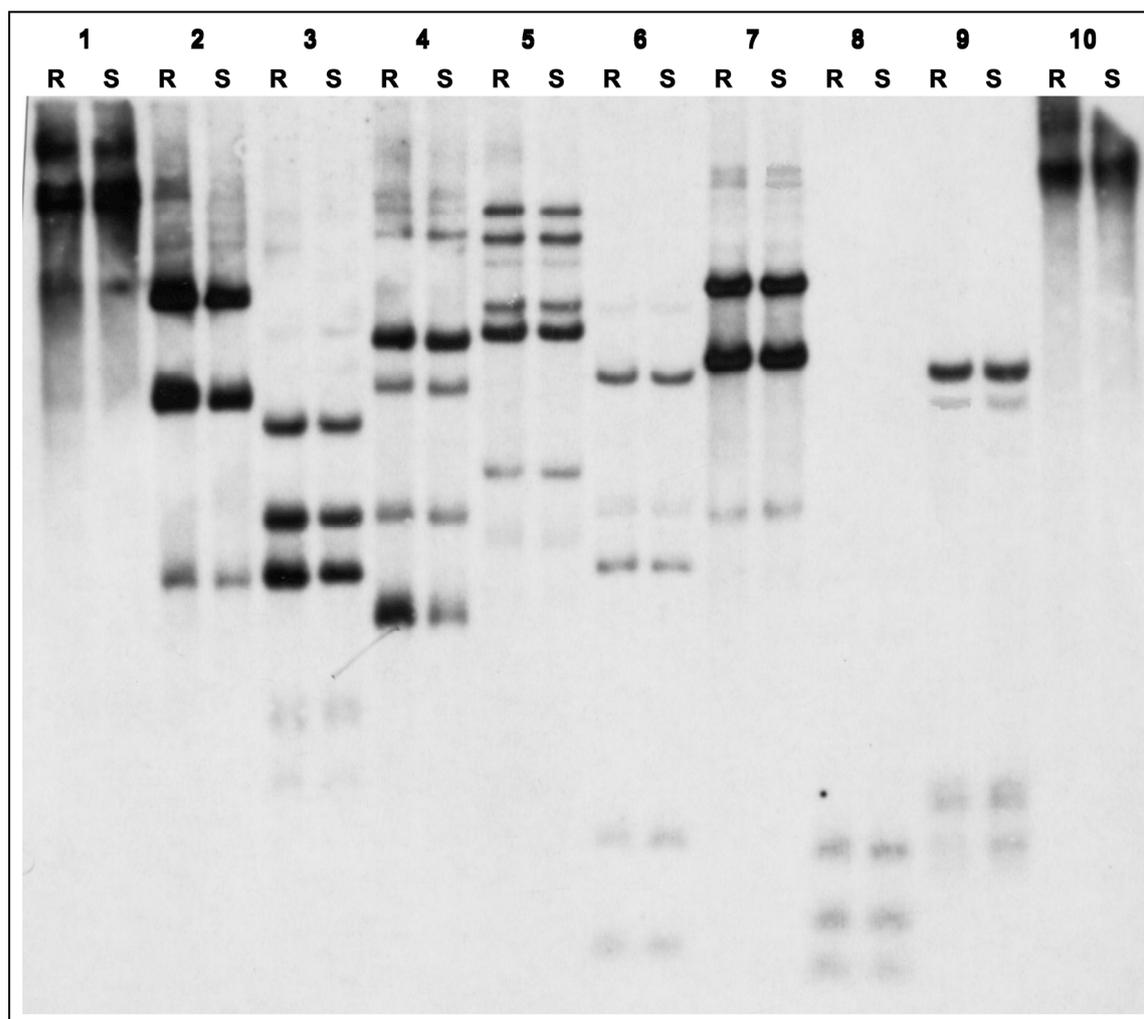


Figura 9. Análisis mediante RFLP de los *bulks* resistente (R) y susceptible (S) empleando las enzimas de restricción *XhoI*, *HinfI*, *DdeI*, *HindIII*, *DraI*, *EcoRI*, *XbaI*, *StyI*, *EcoRV* y *BamHI* (1 al 10). Autorradiografía de los perfiles de RFLP obtenidos con la sonda GP34 marcada radioactivamente.

Por otra parte, se ensayaron los marcadores tipo CAPS, SPUD237 y GP21, asociados al gen de resistencia hipersensible al PVX, *Nb*, localizado en cromosoma V (De Jong y col., 1997). Estos marcadores se analizaron sobre los *bulks* B2R y B2S mediante el empleo de PCR y posterior corte con la enzima de restricción *AluI* que revelaba el polimorfismo según se describe en el trabajo original (De Jong y col., 1997), y también se emplearon otras enzimas de restricción que reconocen 4 bases (*MboI*, *MseI*, *MspI*, *RsaI* y *TaqI*) para

analizar exhaustivamente posible variaciones en la secuencia obtenida entre los *bulks* de *S. commersonii*. Los marcadores CAPS ligados al gen de resistencia hipersensible *Nb*, resultaron monomórficos entre los *bulks* resistente y susceptible.

Estos resultados pusieron en evidencia la posibilidad de que el gen de resistencia extrema a PVX MS presente en *S. commersonii* estuviera localizado en una posición del genoma diferente a la de los genes de resistencia previamente descritos.

7.4. Análisis de segregantes agrupados (BSA) con marcadores RAPD

Se empleó la técnica de RAPDs ajustada previamente empleando la ADN polimerasa termoestable fragmento Stoffel (Martínez, 1997). Esta enzima carece de actividad 5'-3' exonucleasa y se emplea frecuentemente en estudios de mapeo mediante RAPD debido a que asegura una mayor reproducibilidad (Sobral y Honeycutt, 1993).

Con el objeto de identificar polimorfismos en el patrón de bandas amplificadas, ligados únicamente al alelo de resistencia, los *bulks* B2R y B2S (11 y 10 individuos, respectivamente) se analizaron mediante la técnica de RAPD. El tamaño de los *bulks* empleados, se determinó empíricamente en base al nivel de detección (Giovannoni y col., 1991; Michelmore y col., 1991; Martínez, 1997).

Se probó un total de 340 iniciadores (10 pb de longitud), 80% de los cuales mostraron productos de amplificación, obteniéndose un promedio de 5 bandas nítidas (de 2 a 9 *loci*) por iniciador (**Figura 10**).

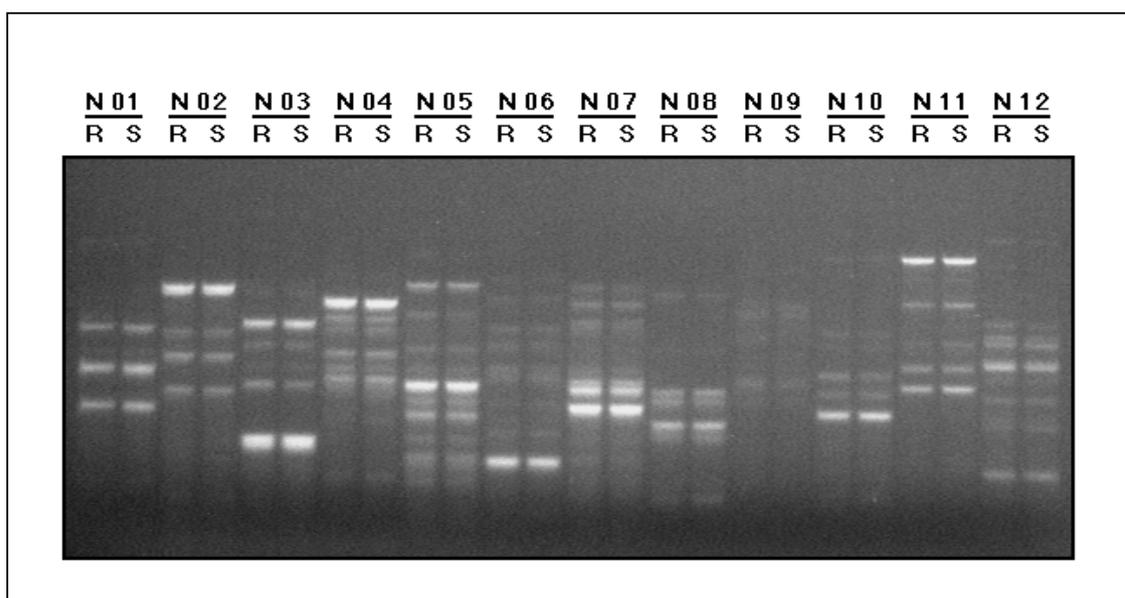


Figura 10. Perfiles de RAPD obtenidos con 12 iniciadores (N01 a N12) y los *bulks* B2R (R) y B2S (S) utilizados como templado. Electroforesis en gel de agarosa 1,5%, TBE 1X, teñido con BrEt.

Considerando a cada banda como un *locus* independiente, se analizó un total de 1.400 *loci* mediante esta técnica.

De los iniciadores analizados ninguno reveló fragmentos polimórficos entre los *bulks* que estuvieran ligados a la resistencia.

7.5. Análisis de segregantes agrupados (BSA) con marcadores AFLP

Para aplicar la metodología de AFLP, se emplearon las condiciones ajustadas previamente empleando los *bulks* B3R-B3S ya que presentaban un fondo genético más homogéneo y, en consecuencia, una menor probabilidad de aparición de falsos positivos mediante esta metodología (Martinez, 1997).

Se generaron perfiles de AFLP empleando 165 combinaciones de iniciadores *EcoRI/MseI*. Estas combinaciones corresponden al empleo de 11 iniciadores *EcoRI*+3 y 15 iniciadores *MseI*+3, la mayoría de las cuales (90%) mostraron amplificación con un promedio de 50 bandas (entre 50 y 700 pb de tamaño) por combinación. Considerando cada fragmento de AFLP como un *locus* independiente, sin tener en cuenta posibles alelismos entre diferentes fragmentos, se analizaron aproximadamente 8.250 *loci*.

Los patrones de bandas de AFLP mostraron ser altamente reproducibles en concordancia con los resultados obtenidos previamente (Martínez, 1997).

Entre las combinaciones de iniciadores analizadas, 10 evidenciaron bandas polimórficas nítidas entre los *bulks*. Estos polimorfismos fueron absolutamente reproducibles en los diferentes ensayos.

Para cuantificar el grado de ligamiento entre los marcadores polimórficos hallados y el *locus* de interés, se analizó posteriormente la población segregante a partir de la cual se generaron los *bulks*. Así, los marcadores polimórficos se evaluaron en forma individual, realizando amplificaciones de AFLP sobre el ADN de cada segregante de la población 78. De esta manera, se determinó la frecuencia de la presencia de la banda polimórfica entre los individuos resistentes y entre los susceptibles, estimándose el grado de ligamiento entre el marcador y el gen de resistencia. Se observó que para cada combinación de iniciadores, los patrones de bandas de los *bulks* se correspondían con los que presentaban los segregantes. Este análisis permitió descartar 9 marcadores no ligados al carácter de interés.

7.6. Un marcador de AFLP ligado al gen *Rx_{cmm}*

Con la combinación de iniciadores E38M42 (E-ACT/M-AGT) se obtuvo el marcador asociado más cercano al carácter de interés, es decir, una banda de aproximadamente 500 pb presente en el *bulk* resistente y ausente en el *bulk* susceptible. A este marcador se lo denominó E38M42(500).

Este marcador se evaluó en la progenie de la población 78 como así también en las otras dos poblaciones disponibles. Los resultados se muestran en la **Tabla 8**.

Tabla 8. Análisis estadístico del grado de ligamiento entre el marcador E38M42(500) y el gen *Rx_{cmm}*. Poblaciones, frecuencias fenotípicas, valores de χ^2 para la prueba de bondad de ajuste a las proporciones esperadas 1:1 (χ^2 RS, χ^2 1 0) y 1:1:1:1 (χ^2 1:1:1:1), y la frecuencia de recombinación entre los *loci*.

Población	Fenotipos ^a				χ^2 R S	χ^2 1 0	χ^2 1:1:1:1	Frecuencia de recombinación
	R1	R0	S1	S0				
78	26	0	3	15	1,45 ^b	4,45 ^b	38,72 ^c	0,068
93	11	2	5	11	0,31 ^b	0,31 ^b	8,38 ^c	0,241
1.007	6	0	6	2	0,28 ^b	7,14 ^c	7,71 ^c	0,428
Total	43	2	14	28	0,10 ^b	8,38 ^c	43,25 ^c	0,183

^a Fenotipos: R 1: resistente y presencia de marcador; R 0: resistente y ausencia de marcador; S 1: susceptible y presencia del marcador; S 0: susceptible y ausencia del marcador. ^b $p > 0,05$; ^c $p < 0,05$.

Se comprobó que los pares de alelos para el marcador y el gen de resistencia se comportaron correctamente desde el punto de vista genético de segregación mendeliana. En ese sentido, se puede observar que el comportamiento del par de alelos (resistencia/susceptibilidad) correspondiente al carácter de interés, ajustó a la segregación esperada para las tres poblaciones. Lo mismo ocurrió para el marcador (presencia/ausencia de banda), mostrando para la población 1007 cierta distorsión en la segregación probablemente causada por el bajo número de individuos que fue posible analizar en la misma.

Como se puede observar, para las tres poblaciones la segregación obtenida difirió significativamente de la razón 1:1:1:1 esperada. Así la segregación observada no se ajustó al modelo teórico de independencia y por lo tanto se pudo aceptar la existencia de un fenómeno de ligamiento del marcador estudiado con el gen de interés. Debido a que las poblaciones 78, 93 y 1.007 constituyen la progenie del mismo padre resistente (todos los individuos son, por lo menos, medios hermanos entre sí) y dado que la segregación fenotípica observada para el carácter de resistencia ajustó a la proporción 1:1 para cada una

de las tres poblaciones, fue posible agrupar los datos y tratarlas como una única gran población (designada en la **Tabla 8** como "Total") para así aumentar el número de individuos analizados y, como consecuencia, la confiabilidad estadística de las conclusiones. El análisis de esta población "Total" mostró ajuste a las proporciones fenotípicas esperadas para el carácter y distorsión en la segregación para el marcador debido al efecto de la población 1007. El tratamiento de las tres poblaciones de manera conjunta también permitió rechazar la hipótesis de independencia del marcador y el carácter, confirmando el fenómeno de ligamiento.

Como se puede observar las clases R1 y S0 son mayoritarias, con lo cual, el marcador se encontró ligado en fase de acoplamiento. Posteriormente, se obtuvieron los porcentajes de recombinación. Para la población 78, dada la existencia de 3 individuos recombinantes (susceptibles con presencia de banda, ver **Figura 11**) el marcador E38M42(500) se encontró ligado a 6,8% de recombinación

Esta frecuencia de recombinación se transformó en distancias de mapa empleando el programa MAPMAKER v.3.0 (Lander y col., 1987) y la función de mapa de Kosambi (Kosambi, 1944). La distancia resultante entre el marcador E38M42(500) y el gen de resistencia Rx_{cmm} fue de 6,9 cM (LOD=8,49).

El empleo de marcación radiactiva del iniciador E38 en el protocolo de AFLP también permitió la observación del marcador E38M42(500), poniendo en evidencia que el fragmento de interés tendría un extremo de tipo *EcoRI*. En caso contrario, el mismo no hubiera sido observable por el método radiactivo.

Se analizó si la combinación de iniciadores de AFLP E38M42 (E-ACT/M-AGT) había sido evaluada en la generación del mapa ultradenso de marcadores (*Ultra High Density Map*) de papa disponible públicamente (<http://cbsgdbase.wur.nl/UHDdata.html>, Van Os y col., 2006). Esta combinación no fue analizada en este mapa, por lo que no se pudo obtener información adicional que hubiera sido útil para referenciar la localización del gen Rx_{cmm} .

Posteriormente, se intentó clonar este marcador de AFLP para transformarlo en un marcador tipo SCAR. Si bien se realizaron varios intentos empleando distintos métodos para el aislamiento, purificación y clonado del fragmento de interés (ver Materiales y Métodos, 6.12.1.) no se obtuvieron resultados favorables y se decidió proseguir con el empleo de otras metodologías para la obtención de nuevos marcadores ligados al carácter de resistencia.

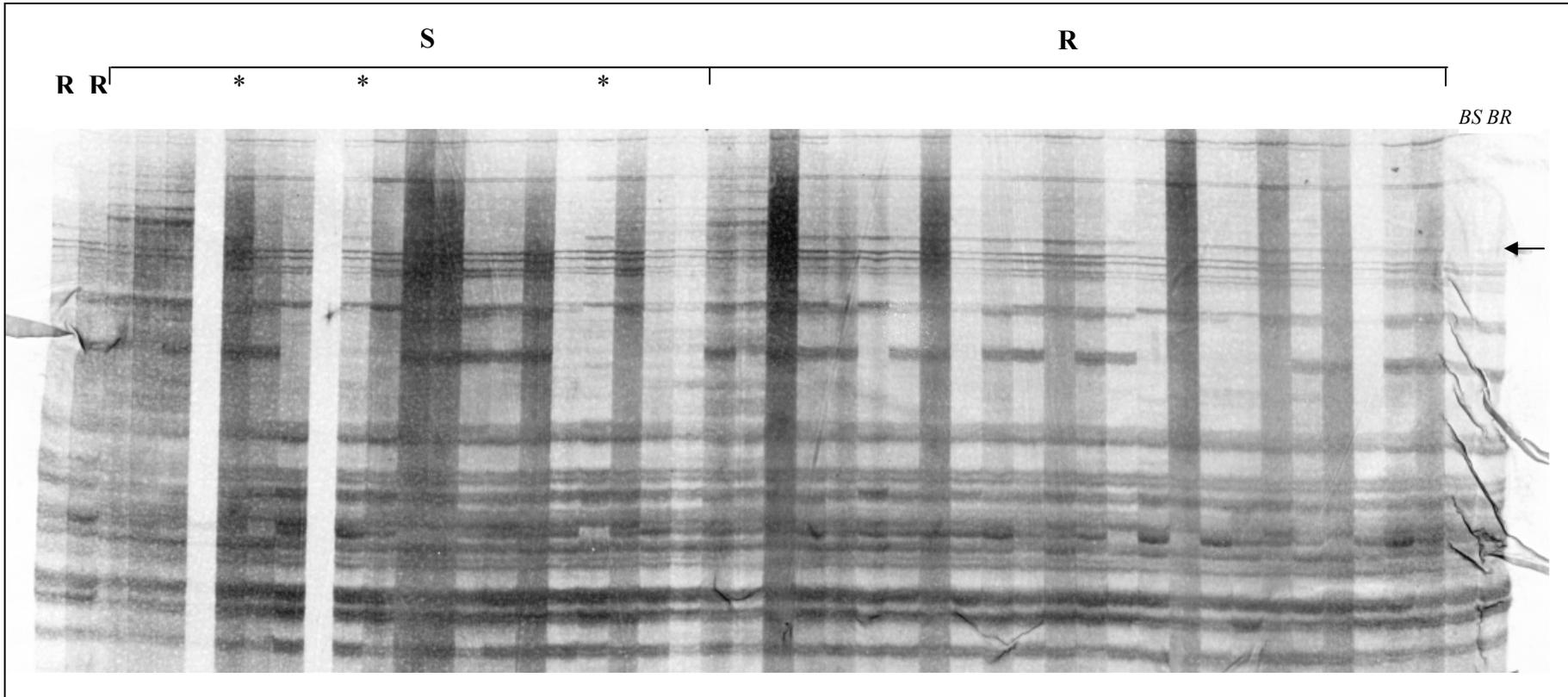


Figura 11. Análisis de los segregantes de la población 78 y los bulks B3R (*BR*) y B3S (*BS*) con la combinación de iniciadores E38M42. La banda de interés se indica con una flecha. R: individuos resistentes, S: individuos susceptibles, *: Individuos recombinantes. Perfiles de AFLP visualizados mediante tinción con plata.

7.7. Análisis de grupos de segregantes (BSA) mediante RGAs

Con el objetivo de identificar otros marcadores asociados al carácter resistencia a PVX MS, se emplearon marcadores RGA. Para ello, se utilizaron las diferentes combinaciones de iniciadores empleadas en papa por Leister y colaboradores (1996) para la amplificación de este tipo de marcadores. Las combinaciones de iniciadores se denominaron C1 (s1+as1), C2 (s1+as3), C3 (s2+as1) y C4 (s2+as3) (ver Materiales y Métodos, **Tabla 4**) y se emplearon los *bulks* B1R y B1S como templado.

En el inicio, los productos de amplificación se resolvieron mediante electroforesis en gels de agarosa. Esto mostró diferentes patrones de amplificación para cada una de las combinaciones de iniciadores, con un promedio de 4 bandas claramente visibles en un rango de tamaño de 200 a 500 pb. Este análisis no mostró bandas polimórficas entre los *bulks* (**Figura 12**).

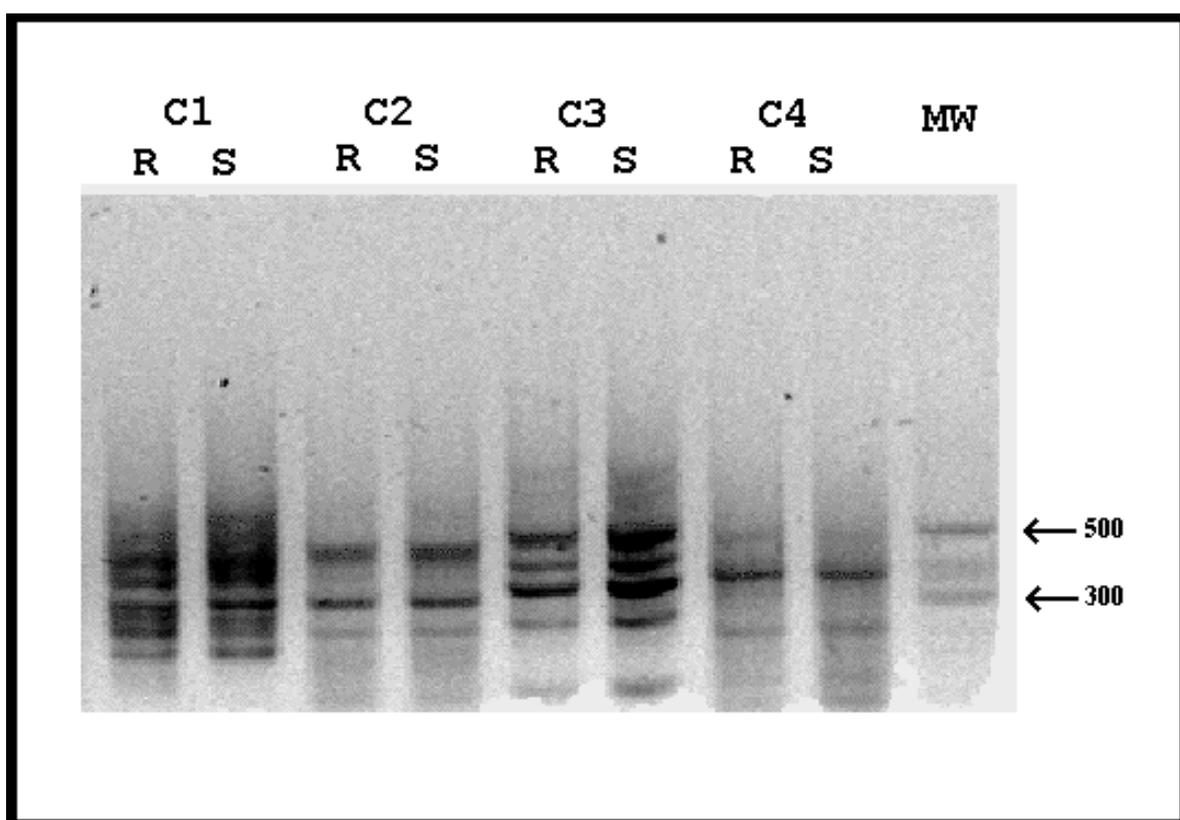


Figura 12. Análisis de los *bulks* B1R (R) y B1S (S) con las combinaciones de iniciadores de RGAs, C1 (s1+as1), C2 (s1+as3), C3 (s2+as1) y C4 (s2+as3). MW: marcador de peso molecular, fragmentos en pb. Electroforesis en gel de agarosa 1%, TAE 1X, teñido con EtBr.

Se decidió resolver los productos de amplificación mediante electroforesis en geles de poliacrilamida de alta resolución visualizados mediante tinción con plata. Con esta técnica más resolutive se obtuvo un patrón de amplificación más amplio con más de 50 bandas para cada combinación de iniciadores. Esta complejidad inesperada en el perfil de amplificación derivada del alto número de fragmentos obtenidos dificultó la detección precisa de bandas polimórficas. Empleando la combinación C1 (s1+as1), se observaron patrones de amplificación sutilmente diferentes entre los *bulks*. Las combinaciones C2, C3 y C4, las cuales involucraban al menos un iniciador que presenta bases inosina en su secuencia, mostraban patrones con un fondo oscuro (alto *background*) interfiriendo con la lectura de las bandas. Este fenómeno no pudo ser mejorado mediante modificaciones en los distintos parámetros o condiciones de la PCR. Por lo tanto, se decidió profundizar el estudio empleando la combinación C1. Así, se agregó una base extra en el extremo 3' de cada uno de los iniciadores, generándose 4 iniciadores s1+1 y 4 iniciadores as1+1 (siendo +1= A, C, G o T; respectivamente). Estas 16 combinaciones se utilizaron en nuevas reacciones de amplificación. Se obtuvieron nuevos patrones de amplificación que curiosamente no presentaban una marcada reducción en el número de bandas comparado con el patrón originalmente obtenido con la combinación s1/as1 y los perfiles de amplificación eran marcadamente diferentes entre las 16 combinaciones analizadas (**Figura 13**).

Mediante esta aproximación experimental se obtuvo un promedio de 50 bandas claramente detectables. Considerando a cada banda como un *locus* independiente, se analizaron 800 *loci* (potenciales RGA) mediante esta técnica.

Mediante el empleo de los iniciadores con una base extra se detectaron dos combinaciones, s1+A/as1+T y s1+G/as1+T, que revelaron fragmentos polimórficos entre los *bulks*. Así, la combinación s1A/as1T reveló un fragmento de 600 pb presente en el *pool* resistente y ausente en el susceptible. De la misma forma, la combinación s1+G/as1+T reveló un fragmento de 400 pb presente en el *pool* resistente y ausente en el susceptible.

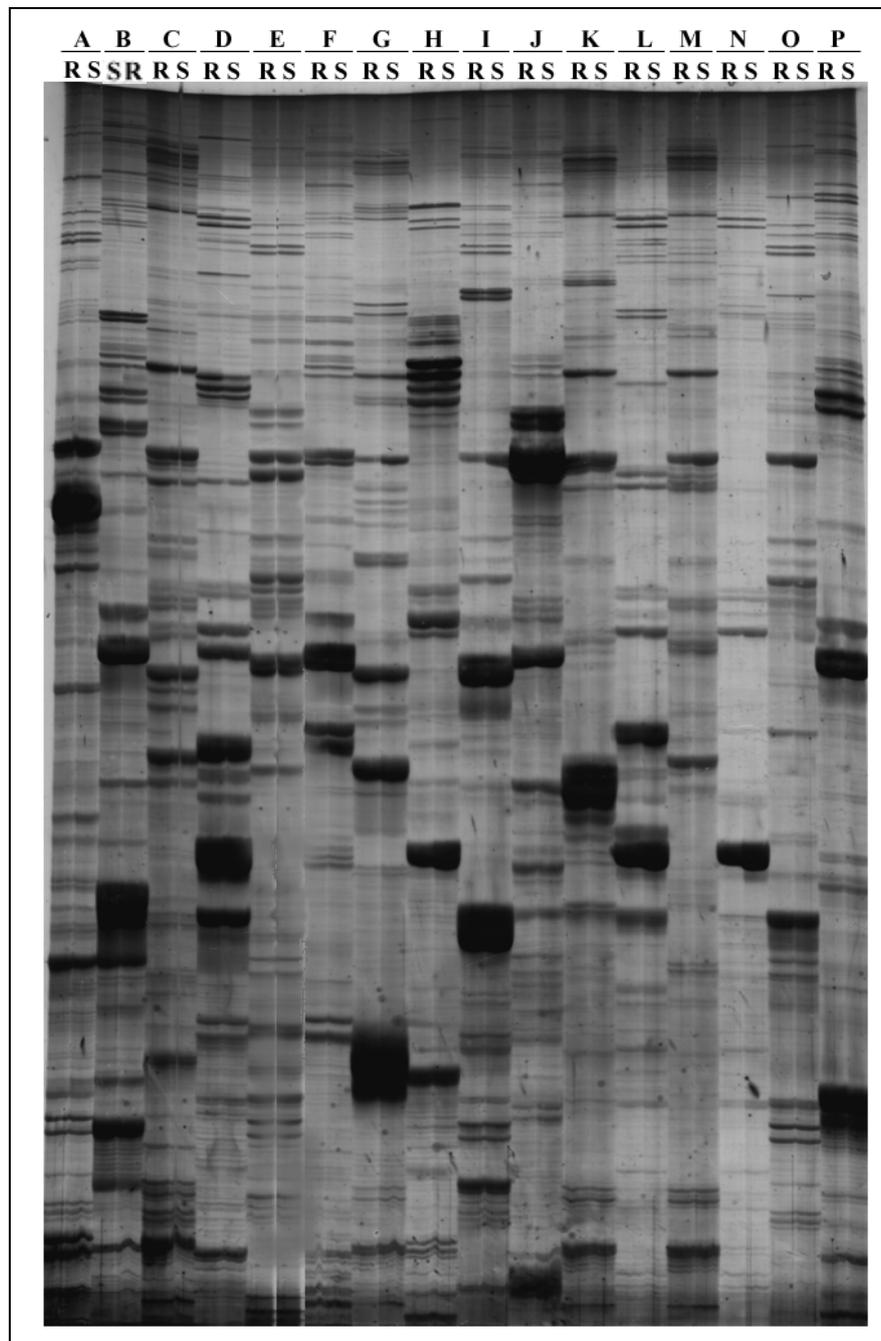
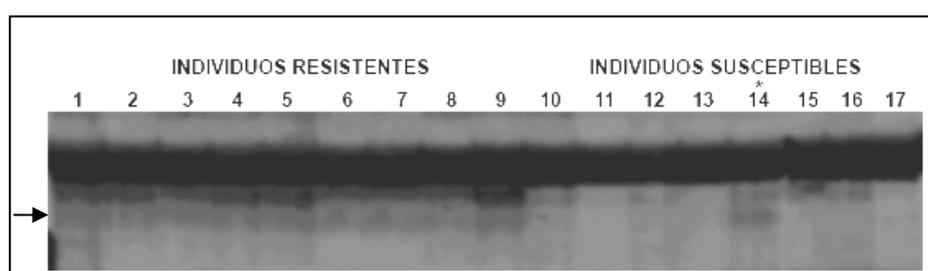


Figura 13. Análisis de los productos de amplificación obtenidos con las 16 combinaciones de iniciadores de RGAs $s1+1/as1+1$ comparando los *bulks* B1R (R) y B1S (S). A: $s1+A/as1+A$, B: $s1+A/as1+T$, C: $s1+G/as1+T$, D: $s1+A/as1+C$, E: $s1+C/as1+A$, F: $s1+C/as1+C$, G: $s1+C/as1+G$, H: $s1+C/as1+T$, I: $s1+G/as1+A$, J: $s1+G/as1+C$, K: $s1+G/as1+G$, L: $s1+A/as1+G$, M: $s1+T/as1+A$, N: $s1+T/as1+C$, O: $s1+T/as1+G$, P: $s1+T/as1+T$. Electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante revelado mediante tinción con plata.

7.8. Dos marcadores RGA ligados al gen *Rx_{cmm}*

Los marcadores polimórficos identificados se analizaron de manera individual en la población 78 sobre los individuos segregantes para el carácter de interés. Para realizar el análisis de cosegregación se utilizaron los iniciadores que originaron los polimorfismos para realizar ampliaciones sobre el ADN de los individuos segregantes y verificar el ligamiento. Como resultado, el marcador de RGA generado por la combinación s1G/as1T que mostraba una banda de aproximadamente 400 pb presente en el *bulk* resistente y ausente en el susceptible, reveló 8 recombinantes en 40 individuos con amplificación positiva (**Figura 14**).



FFigura 14. Perfiles de amplificación de RGAs de 17 individuos segregantes usando la combinación s1G/as1T. Se indican los individuos resistentes (INDIVIDUOS RESISTENTES, 1 a 9) y susceptibles (INDIVIDUOS SUSCEPTIBLES, 10 a 17). El asterisco (*) indica el individuo recombinante. El fragmento de RGA de interés se destaca mediante una flecha. Electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante revelado mediante tinción con plata.

La combinación de iniciadores s1+A/as1+T mostró un fragmento presente en el *pool* resistente y ausente en el susceptible de aproximadamente 600 pb. Este marcador de interés se analizó luego en los individuos segregantes para la resistencia a PVX de la población 78 evidenciando 9 recombinantes en el total de 41 individuos que mostraron amplificación (**Figura 15**).

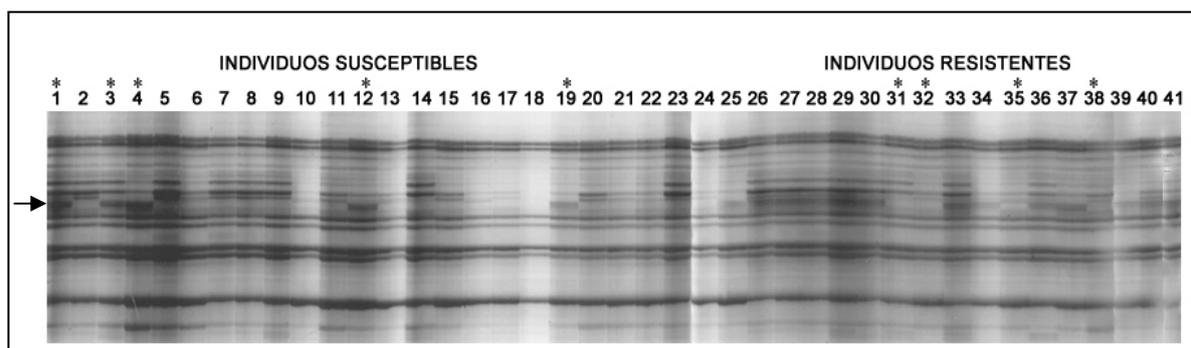


Figura 7. Perfiles de amplificación de RGAs de 41 individuos segregantes usando la combinación s1+A/as1+T. Se indican los individuos susceptibles (INDIVIDUOS SUSCEPTIBLES, 1 a 24) y resistentes (INDIVIDUOS RESISTENTES, 25 a 41). Los individuos recombinantes se indican con un asterisco (*). El fragmento de RGA de interés se destaca mediante una flecha. Electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante revelado mediante tinción con plata.

El análisis estadístico del marcador RGA s1+G/as1+T mostró que tanto la segregación del carácter como la del marcador se comportaba correctamente desde el punto de vista genético mendeliano ($\chi^2_{1R:1S}=2,5$ y $\chi^2_{1(1):1(0)}=0,9$; $p>0,05$). La prueba de independencia permitió aceptar un fenómeno de ligamiento entre el marcador RGA s1+G/as1+T y el carácter resistencia a PVX MS ($\chi^2_{1(R1):1(R0):1(S1):1(S0)}=17,8$; $p<0,05$) a una frecuencia de recombinación de 0,20.

De la misma forma, el análisis para el marcador RGA s1+A/as1+T mostró que tanto la segregación del carácter como la del marcador se comportaba correctamente desde el punto de vista genético mendeliano ($\chi^2_{1R:1S}=1,97$ y $\chi^2_{1(1):1(0)}=1,19$; $p>0,05$). La prueba de independencia permitió aceptar un fenómeno de ligamiento entre este marcador y el carácter en estudio ($\chi^2_{1(R1):1(R0):1(S1):1(S0)}=16,07$; $p<0,05$) a una frecuencia de recombinación de 0,22.

Las frecuencias de recombinación halladas se transformaron en distancias de mapa empleando el programa MAPMAKER v. 3.0 (Lander y col., 1987) y la función de mapa de Kosambi (Kosambi, 1944).

El marcador RGA s1+G/as1+T se encontró ligado al gen de resistencia extrema *Rx_{cm}* a PVX MS a una distancia de 21,2 cM (LOD=3,35).

El marcador RGA s1+A/as1+T se encontró ligado al gen de interés a una distancia de 23,6 cM (LOD=3).

7.9. Análisis mediante marcadores AFLP-RGA

Se ensayó la metodología de AFLP-RGA (Hayes y Saghai-Marroof, 2000) en la cual se realiza todo el protocolo de AFLP pero en el paso de amplificación final se emplea un iniciador de AFLP (en general, los derivados del sitio *EcoRI*) combinado con un iniciador de RGA, en lugar de dos iniciadores +3 (*EcoRI/MseI*).

Debido a los resultados obtenidos en el análisis de RGAs, esta metodología fue levemente modificada empleando el iniciador *EcoRI*+1 y los 8 iniciadores RGA+1 (4 iniciadores s1+1 y 4 iniciadores as1+1). Por otra parte, en lugar de emplear detección radiactiva de los fragmentos, se utilizó el revelado por tinción con plata. Se realizaron controles de amplificación empleando los iniciadores *EcoRI*+1, as1 y s1 de manera individual.

Se analizaron los *bulks* BR1 y BS1 con ocho combinaciones de iniciadores resultando en un promedio de 40 bandas por combinación. Considerando a cada banda como un *locus* independiente, se analizaron 320 *loci* mediante esta técnica (**Figura 16**). Finalmente, si bien se detectaron bandas polimórficas entre los *bulks*, estas no se encontraron asociadas al carácter de interés.

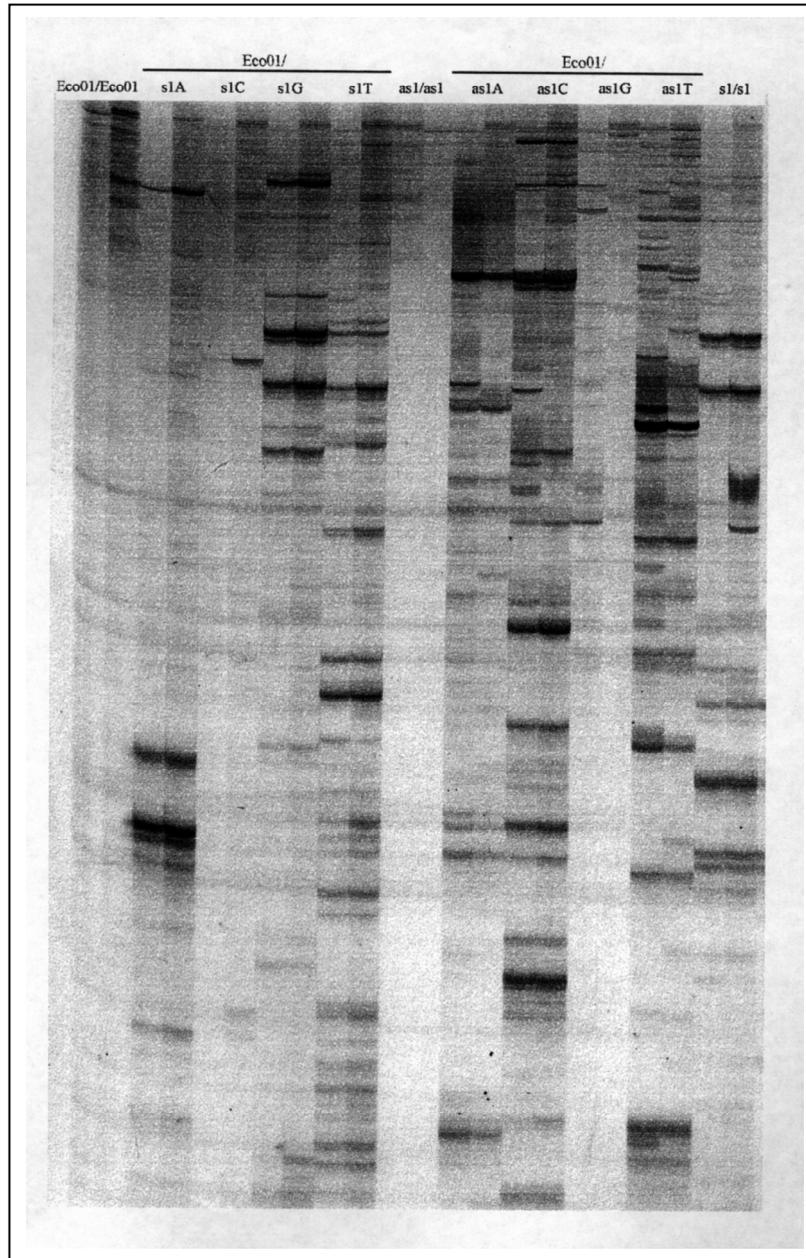


Figura 16. Perfiles de de amplificación obtenidos comparando los *bulks* B1R (calle izquierda) y B1S (calle derecha) de a pares, con las 8 combinaciones de iniciadores *EcoRI*+1(*Eco01*) y RGAs s1+1 (s1A, s1C, s1G y s1T) y as1+1 (as1A, as1C, as1G y as1T). Se observan los controles empleando los iniciadores *EcoRI*+1(*Eco01/Eco01*), s1 (s1/s1) y as1 (as1/as1) de manera individual. Electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturizante revelado mediante tinción con plata.

7.10. Clonado de los fragmentos RGA polimórficos obtenidos

Una vez identificados los dos marcadores de RGA de interés (ver 7.8.) se procedió a aislar y purificar los mismos, partiendo del fragmento cortado del gel de poliacrilamida y empleando diferentes métodos.

Se pudo clonar exitosamente el marcador obtenido con la combinación s1+A/as1+T empleando el método 3 (ver 6.12.1 Materiales y Métodos).

El marcador generado por s1+G/as1+T no pudo ser aislado, aún empleando distintos protocolos repetidas veces.

Posteriormente, el fragmento purificado correspondiente al marcador obtenido con la combinación s1+A/as1+T fue clonado en el vector pGEM-T para, luego de la selección y caracterización de los clones recombinantes, proceder a su secuenciación.

7.11. Análisis del marcador RGA(584)

7.11.1 Análisis de la secuencia del fragmento RGA clonado

Luego de realizar los controles pertinentes (digestión con enzima de restricción, análisis del tamaño del fragmento liberado, amplificación del fragmento con los iniciadores específicos y análisis del producto amplificado) se procedió a secuenciar el marcador generado por s1+A/as1+T. La secuencia definió el tamaño del fragmento en 584 pb. Se decidió llamar a este marcador RGA(584) y la secuencia obtenida fue depositada en la base de datos del NCBI con el número AF219941.

Esta secuencia (sin incluir la secuencia correspondiente a los iniciadores de RGA) se comparó con bases de datos de secuencias (GenBank, EMBL, etc) empleando los algoritmos BLAST2 (*Basic Local Alignment Search Tool*, Altschul y col., 1990) y/o FASTA (*FastA*, Lipman y Pearson, 1985 y 1988) disponibles vía internet. Los parámetros utilizados para los análisis fueron aquellos que los portales de acceso utilizan por defecto.

El mayor grado de identidad se obtuvo con la secuencia (número de acceso al GenBank AY007367.1) correspondiente al gen *Sw-5* que confiere resistencia al tospovirus TSWV de tomate (*Tomato Spotted Wilt Virus*, conocido como Virus de la mancha negra del tomate). La identidad resultante fue del 90% (496 nt coincidentes/550 nt totales). Asimismo, presentó similitud (65-80%) con regiones de las secuencias de putativos genes de resistencia de tabaco, pimiento, avena, arroz y trigo. También se obtuvo una elevada

Debido a la similitud del marcador RGA(584) con el EST de papa TC130183, se evaluó en este último la posible existencia de un marcador SSR consultando la base de datos de TIGR (<http://tigr.org/tigr-scripts/sgeb/SSR/query>). La secuencia TC130183 no presentó un marcador SSR asociado.

Finalmente, en base a la secuencia del marcador RGA(584), se diseñaron iniciadores específicos para posibilitar su evaluación como un marcador tipo SCAR, independizándose de las condiciones de análisis de RGA.

7.11.2. Análisis de una genoteca de BAC de *S. bulbocastanum* con el marcador RGA(584)

El laboratorio disponía de una genoteca (*BAC library*) de *S. bulbocastanum*, (especie silvestre de papa originaria de México y Guatemala), compuesta por 18.432 clones, con un tamaño promedio de inserto de 155 kpb y con una cobertura del genoma de 3,57X (tamaño estimativo del genoma: 800 Mpb). Se decidió analizar esta genoteca de manera exploratoria, mediante hibridación del filtro de alta densidad empleando el marcador RGA(584) como sonda marcada radiactivamente.

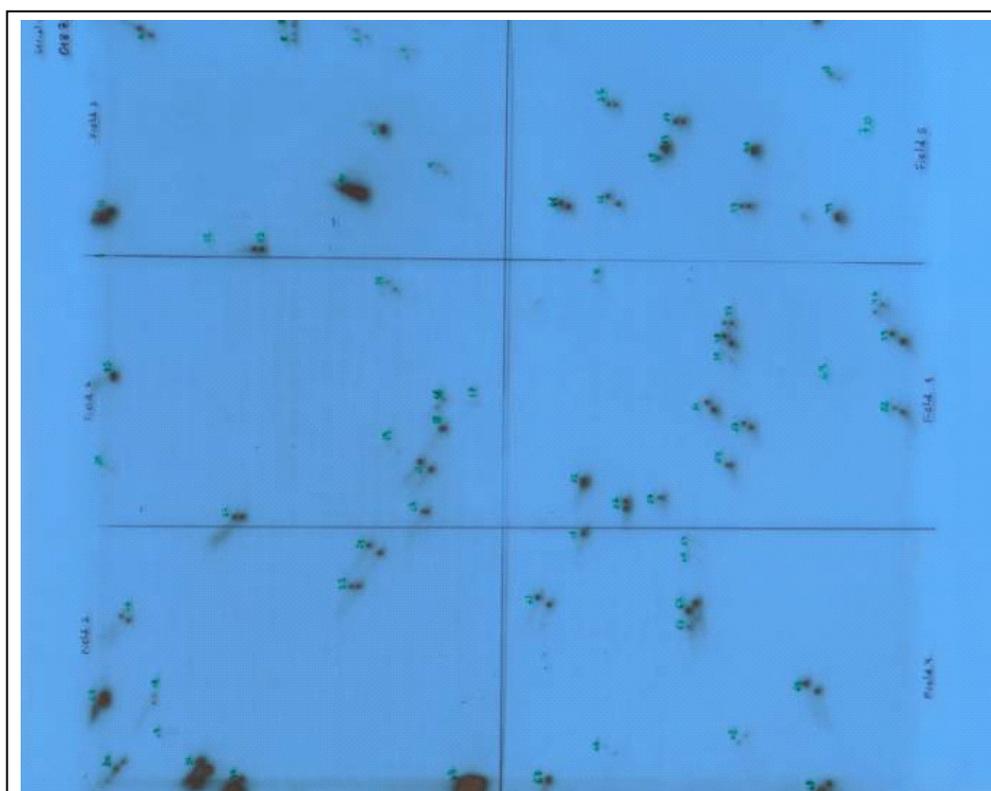


Figura 18. Análisis de la genoteca de *S. bulbocastanum* por hibridación del filtro, empleando el marcador RGA(584) como sonda marcada radiactivamente. Autorradiografía que permite detectar un total de 70 clones positivos.

La hibridación de esta sonda heteróloga marcada radiactivamente se realizó a 65°C y los lavados posteriores de la membrana se realizaron en condiciones de baja astringencia. Luego de la exposición a una placa autoradiográfica, se detectaron 70 clones positivos (**Figura 18**).

Posteriormente, estos 70 clones de interés se purificaron por la técnica de minipreparación de plásmidos de alto peso molecular y se analizaron por PCR empleando iniciadores específicos para el marcador RGA(584). Este segundo análisis mostró aproximadamente un 50% de clones positivos, con un producto de amplificación con distinto grado de intensidad y, en algunos casos, presencia de bandas de un tamaño menor al esperado (**Figuras 19A**). Los clones positivos fueron nuevamente analizados por PCR y se obtuvieron 32 clones que mostraban la banda del tamaño esperado de aproximadamente 500 pb pero con diferente intensidad (**Figuras 19B**).

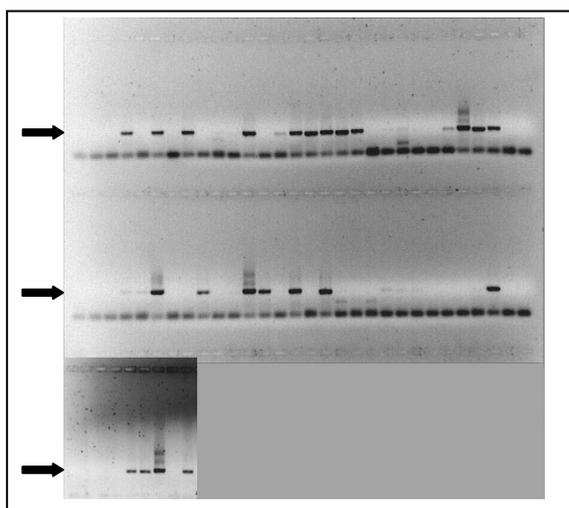


Figura 19A. Productos de PCR de los 70 clones analizados. Electroforesis en gel de agarosa 1%, TAE 1X, teñidos con BrEt. El producto de 500pb se marca con una flecha.

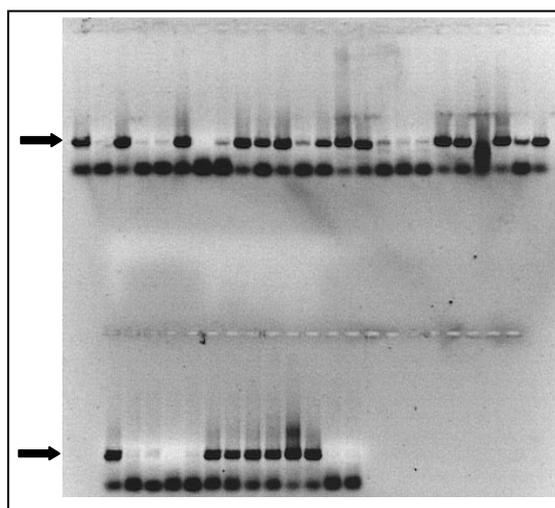


Figura 19B. Productos de PCR de 37 clones seleccionados. Electroforesis en gel de agarosa 1%, TAE 1X, teñidos con BrEt. El producto de 500pb se marca con una flecha.

Empleando ambas estrategias (intensidad de hibridación en el filtro de la genoteca y/o intensidad de la PCR), se seleccionaron 37 clones positivos. Se procedió de esta manera debido a que no se encontró correlación entre intensidad de la señal de hibridación empleando el marcador RGA(584) como sonda con la señal de amplificación obtenida mediante PCR con iniciadores específicos para dicho marcador, indicando que ambas estrategias de análisis pueden ser complementarias y no necesariamente excluyentes.

Para el análisis de *fingerprinting*, los 37 clones aislados se digirieron con la enzima *Hind*III y luego se realizó un *Southern blot* hibridando con el marcador de interés. En las **Figuras 20A** y **20B** se muestra a modo de ejemplo el análisis resultante de 10 clones.

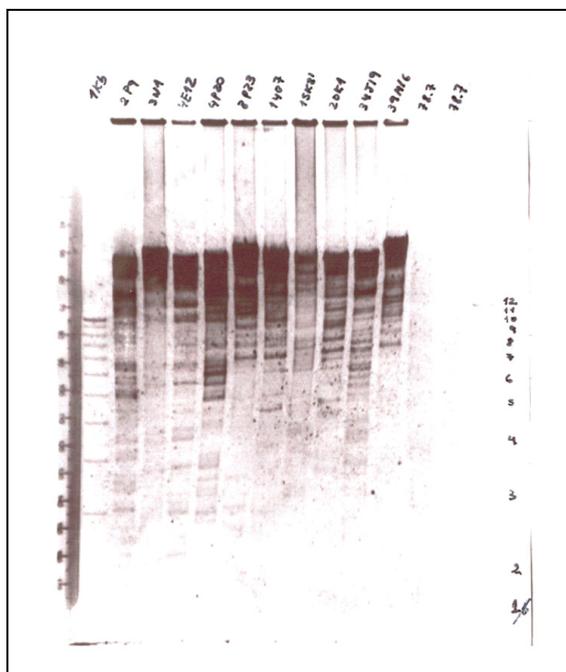


Figura 20A. Electroforesis en gel de agarosa 0,8%, TAE 1X, teñidos con BrEt. ADN de 10 clones de BAC digeridos con *Hind*III.

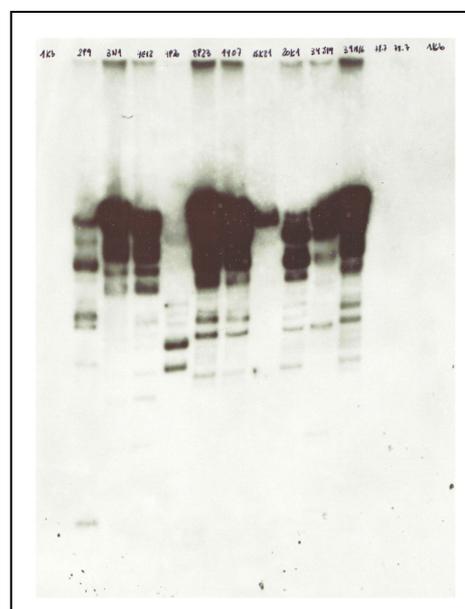


Figura 20B. Autorradiografía con la sonda de marcador RGA(584). ADN de 10 clones de BAC digeridos con *Hind*III.

Este análisis permitió descartar con seguridad clones repetidos debido a que la caracterización usando únicamente el *fingerprinting* con la enzima *Hind*III era difícil de interpretar y no del todo concluyente (**Figura 20A**).

Los 14 clones seleccionados fueron: 2O2, 2P9, 3A1, 3D19, 8P23, 13E14, 14O7, 15K21, 20K1, 21B12, 31E24, 39M16, 41J10 y 48H1. Esta nomenclatura empleada corresponde a: el primer número identifica el número de la microplaca de 384 pocillos, la letra corresponde a la posición en la fila de la microplaca (de A a P) y el segundo número se corresponde con la posición en columna en la misma (de 1 a 24).

Como parte de la caracterización, los 14 clones se trataron con la enzima de restricción *Not*I que libera los insertos de alto peso molecular. Los productos de la digestión se resolvieron mediante electroforesis en campo pulsado (PFGE). Este análisis mostró tamaños de insertos entre 50 y 150kb.

Los 14 clones seleccionados, se emplearon nuevamente como templado en una reacción de amplificación usando los oligonucleótidos correspondientes al marcador RGA(584). Los

productos de PCR se resolvieron mediante electroforesis en gel de agarosa y el fragmento del tamaño esperado se aisló y purificó para cada uno de los clones en estudio. Estos fragmentos se secuenciaron en un sentido empleando el iniciador 584F.

Las secuencias obtenidas se analizaron bioinformáticamente. Esto incluyó el análisis visual de los cromatogramas específicos y la edición “manual” de las secuencias, el análisis comparativo con bases de datos para la búsqueda de similitud y el análisis y construcción de secuencias ensambladas (*contigs*) empleando programas apropiados accesibles mediante internet. Los parámetros utilizados para los análisis fueron aquellos que los portales de acceso utilizan por defecto.

El análisis de los cromatogramas y edición de las secuencias empleando el programa BioEdit® (Tom Hall, <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>) permitió generar secuencias de alta calidad para el posterior análisis.

Así, se obtuvieron las siguientes secuencias depuradas de los clones: 2O2 (451 nt), 2P9 (431 nt), 3A1 (448 nt), 3D19 (406 nt), 8P23 (122 nt), 13E14 (384nt), 14O7 (122 nt), 15K21 (450 nt), 20K1 (420 nt), 21B12 (161 nt), 31E24 (231 nt), 39M16 (166 nt), 41J10 (80 nt) y 48H1 (239 nt).

En el análisis de similitud empleando el algoritmo BLAST2 (*Basic Local Alignment Search Tool*, Altschul y col., 1990), las secuencias obtenidas mostraron alta identidad (90%) con el gen *Sw-5* de tomate (AY007367.1) de acuerdo con los resultados de identidad del marcador RGA(584). Por otra parte, se obtuvo una elevada identidad (mayor al 90%) con dos RGAs aislados de tomate silvestre *Lycopersicon hirsutum* (rebautizada *Solanum habrochaites*) denominados SS14 y SS20 (Número de acceso al GenBank AF534312 y AF534305, respectivamente) (Niño-Liu y col., 2003).

El análisis de las 14 secuencias utilizando el programa de ensamblado de secuencias CAP3 (Huang y Madan, 1999), arrojó como resultado tres secuencias ensambladas (*contigs*) y tres secuencias quedaron como secuencias únicas, sin solaparse (*singletons*).

El *contig* 1 se encontró formado por las secuencias correspondientes a los clones 2O2, 3D19 y 15K21, cubriendo un total de 452 nt.

El *contig* 2 resultó formado por las secuencias correspondientes a los clones 8P23, 14O7 y 20K1, con una longitud de 421 nt.

El *contig* 3 contuvo a las secuencias de los clones 13E14, 21B12, 39M16, 31E24 y 3A1, con una longitud de secuencia de 449 nt.

De esta forma, se obtuvieron dos *contigs* con 3 secuencias cada uno y un *contig* con 5 secuencias, representativos de 11 secuencias y las tres secuencias restantes quedaron como *singletons*. Estas tres secuencias corresponden a los clones 2P9, 41J10 y 48H1

Este resultado indicaría la presencia de distintas copias de la secuencia de interés y de clones de secuencia relacionada, que podrían corresponder a un mismo *locus* en el genoma. Se realizó el alineamiento múltiple de estas secuencias empleando el programa ClustalW (Thompson y col., 1994) conjuntamente con las secuencias: RGA(584) de *S. commersonii* (AF219941), el gen *Sw-5* de tomate (AY007367.1) y los dos RGAs aislados de tomate silvestre que mostraron alta similitud SS14 (AF534312) y SS20 (AF534305). Este análisis mostró una elevada conservación a nivel de nucleótidos entre las 12 secuencias estudiadas. El resultado parcial de este alineamiento se observa en la **Figura 21**.

```

CLUSTAL W (1.82) multiple sequence alignment

2P9-RGA584F      GAGAGAGCT--TTTACAAGATACTTTAGTCAAGTTACCTGTTCCAAGGATGAGGGAGAT 110
ss14             -----
Contig3         GAGAATGCT--TTTACAAGAGATTTTGTAGTCAAGTTACCGGTTCCAAGGACAAGGAAGAT 110
48H1-RGA584F    GAGAAAGCT--ATTACAAGAGATTTTGTAGTCAAGTTACCAATCCAAGGATAAGGGAGAT 112
Contig1         GAGAAAGCT--ATTACAAGAGATTTTGTAGTCAAGTTACCAATCCAAGGATAAGGGAGAT 113
32444          GAGAAAGCT--ATTACAACAGATTTTGTAGTCAAGTTACCGGTTCCAAGGACAAGGGATAT 232
39348          GAGAAAGCT--ATTACAAGAGATTTTGTAGTCAAGTTACCGGTTCCAAGGACAAGGGATAT 236
25182          GAGAAAGCT--ATTACAAGAGATTTTGTAGTCAAGTTACCGGTTCCAAGGACAAGGGGTAT 230
RGA584         GAGAAAGCT--ATTACAAGAGATTTTGTAGTCAAGTTACCTAT--CAAGGACAAGGGAGAT 227
41J10-RGA584F  GAGAAGAGC--TTTTCACAAGATAT-----
Contig2        GAGAATGCT--ATTACAAGAGATTTTGTAGTCAAGTTCCCGTCCCAAGGACAGGGGAGAC 110
SS20          ACATTGACTCATCTACGTGTCATCGCCAGGTCGACTAACTGTCGTTTGTGGTCGTGGATC 107

2P9-RGA584F      -----TATCCTTGCTGACAAGTTGAGGAAAAGCCTAATG 144
ss14             -----
Contig3         AAGG-----ATGACATCCTTGCTGACATGTTGAGGAAAAGTCTAATG 152
48H1-RGA584F    AAGG-----ATGACATCCTTGCTGATGAGTTGAGGAAAAGTCTAATG 154
Contig1         AAGG-----ATGACATCCTTGCTGATGAGTTGAGGAAAAGTCTAATG 155
32444          GAGG-----ATGATATCCTTGCTGATGAGTTGAGGAAAAGTCTAATG 274
39348          GAGG-----ATGATATCCTTGCTGATGAGTTGAGGAAAAGTCTAATG 278
25182          GAGG-----ATGATATCCTTGCTGATGAGTTGAGGAAAAGTCTAATG 272
RGA584         ACCG-----ATGACATCCTTGCTGACATGTTGAGGAAAAGTCTACTG 269
41J10-RGA584F  -----
Contig2        AAGGGAGCCAACCTCAGCCAAGGATGATGTTCTTCCGACATGTTGAGGAAAAGACTAATG 170
SS20          GCCACTTCTGTCAGATTGTAAGTACGTTAAACCTCTAACTCACGTCGAGGTCCTTAGG 167

2P9-RGA584F      GGC-----TCATTGTATTGGATGATATGTGGGATTGTATGGCATGGGATGACTTA 194
ss14             -----TATGGATGATATGTGGGATTGTATGGCATGGGATGACTTA 41
Contig3         GGCAAGAGATATCTCATTGTATTGGATGATATGTGGGATTGTATGGAATGGGAAGACTTA 212
48H1-RGA584F    AGCAACAATAATCTCATTGTATTGGATGATATGTGGCATTCTTCTGGCAGGGATGACTTA 214
Contig1         TGCAAGAGATATCTCATTGTATTGGATGATATGTGGGATTTTATGGCATGGGATGACTTA 215
32444          GGAAGAGATATCTCATTGTCTTGGATGATATGTGGGATTGTATGGCATGGGATGACTTA 334
39348          GGAAGAGATATCTCATTGTCTTGGATGATATGTGGGATTGTATGGCATGGGATGACTTA 338
25182          GGCAAGAGATATCTCATTATCTTGGATGATATGTGGGATTGTATGGCATGGGATGACTTG 332
RGA584         GGAAGAGATATCTCATTGTATTGGATGATATGTGGGATTGTATGGCATGGGATGACTTA 329
41J10-RGA584F  -----
Contig2        GGAAAGAGATATCTCATTGTCTTGGATGATATGTGGGATTGTATGGCATGGGATGACTTG 230
SS20          AACATCA-----CTAAAAAATTTCAACATCAAAAAAGCAAAAACTCACAAAGGACGTCCAA 222

```

Figura 21. Alineamiento de secuencias nucleotídicas obtenido mediante el programa ClustalW. Se muestra una porción representativa de 180 pb del total de los 450 nt analizados. Las secuencias denominadas 32444, 39348 y 25182 corresponden a distintas regiones del *locus* que contiene al gen *Sw-5* de tomate (AY007367.1), las secuencias SS20 (AF534312) y SS14 (AF534312) corresponden a RGAs de tomate silvestre. Las demás secuencias se corresponden a los 3 *contigs* obtenidos (Contig 1, 2 y 3) y a los 3 *singletons* (2P9-RGA584F, 48H1-RGA584F y 41J10-RGA584F). Los *gaps* o espacios introducidos en las secuencias se indican con guiones (-).

7.12. El marcador RGA(584) como sonda de RFLP

7.12.1. Empleo del marcador RGA(584) como sonda de RFLP en *S. commersonii*

Luego del análisis a nivel de secuencia del marcador RGA(584) (7.11.1.) se procedió a caracterizarlo desde el punto de vista de sus propiedades como sonda de RFLP. De esta manera, se lo empleó para detectar polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción, comparando los patrones de digestión de los *bulks* resistente (B2R) y susceptible (B2S) tratados con las enzimas: *Hind*III, *Xho*I, *Eco*RI, *Eco*RV, *Xba*I, *Dra*I, *Bam*HI, *Hin*fI, *Dde*I y *Sty*I. Así, se detectaron polimorfismos claramente observables para los patrones obtenidos con las enzimas *Hind*III y *Sty*I (**Figura 22**).

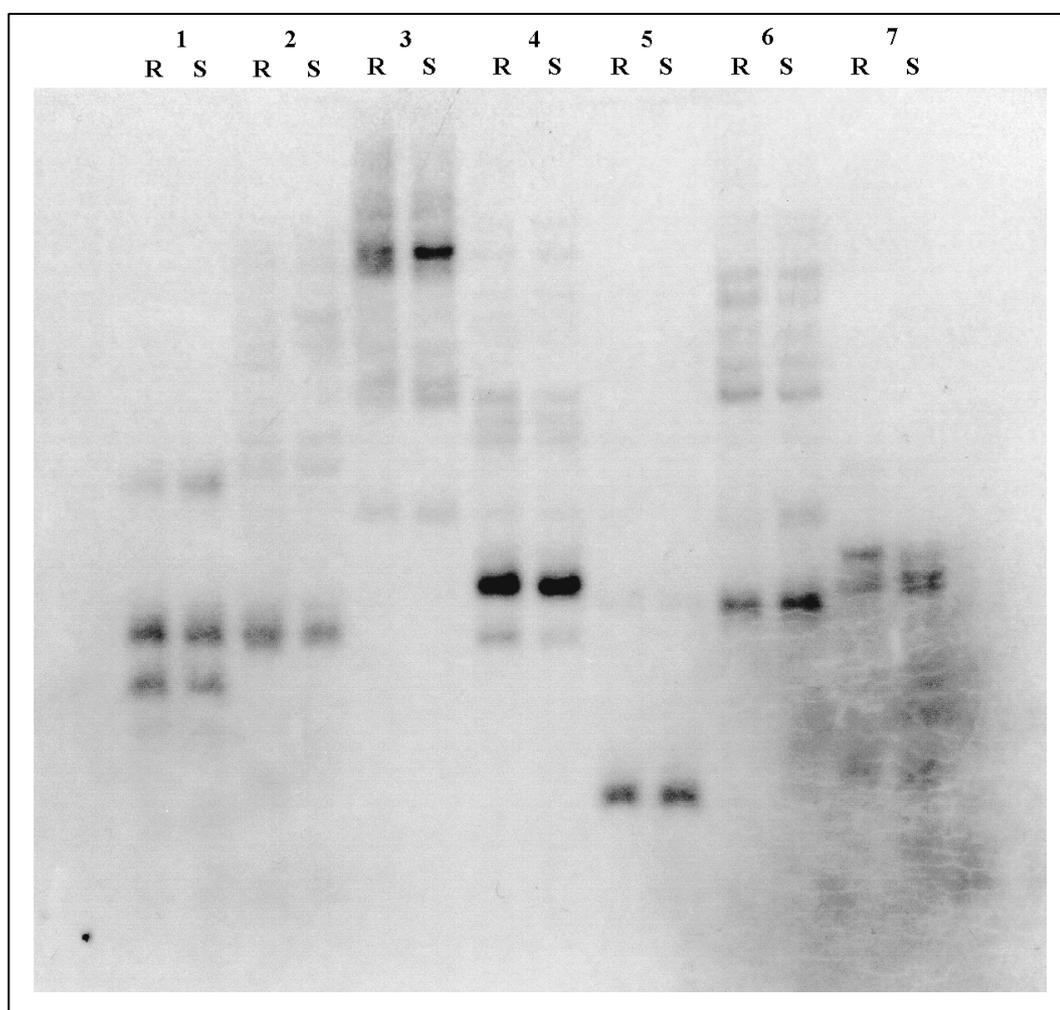


Figura 22. Análisis mediante RFLP de los *bulks* resistente (R) y susceptible (S) empleando las enzimas de restricción *Hin*fI, *Dde*I, *Hind*III, *Dra*I, *Eco*RI, *Xba*I y *Sty*I (1 al 7). Autorradiografía de los perfiles de RFLP obtenidos con la sonda RGA(584) marcada radiactivamente.

Los patrones de RFLP observados, indican que la sonda no correspondería a una secuencia repetitiva. Si ese hubiera sido el caso, se deberían haber obtenido varias bandas detectadas por la sonda para cada una de las enzimas de restricción empleadas.

Se decidió enviar el marcador de interés así caracterizado al grupo de la Dra. Christiane Gebhardt (*Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung*, Köln, Alemania), con el objeto de ubicarlo en un mapa de referencia de papa, mediante el análisis de la población de mapeo F1840. Esta población está compuesta por 100 individuos F1, provenientes de un cruzamiento entre dos líneas diploides heterocigotas de papa (H82.337/49, P18 parental femenino y H80.696/4, P40 parental masculino, híbrido entre *S. tuberosum ssp. tuberosum* y *S. spgazzini*).

7.12.2. Localización cromosómica del marcador RGA(584) en el mapa de referencia de papa.

Luego del empleo del marcador RGA(584) como sonda de RFLP en la población de mapeo de referencia, la información proporcionada por la Dra. Gebhardt fue la siguiente:

- 1) “que el fragmento detecta una familia de genes, como la mayoría de los fragmentos RGA mapeados”,
- 2) “que el *locus* mayor mapea en el cromosoma IX, en una posición distal del mismo, y que podría ser sinténico con el *Sw-5* (gen de tomate de resistencia a un tospovirus, el TSWV (*Tomato Spotted Wilt Virus*))”,
- 3) “que en el cromosoma IX existe un segundo *locus* detectado por esta sonda, en una región más proximal, entre los marcadores *TG105(b)* y *GP(129)*”,
- 4) “un tercer *locus* es detectado en el cromosoma I, cercano al locus *S* y al locus de RGAs *St1.2.4(a)*”.

Estos resultados se muestran en la **Figura 23**, según el esquema enviado por el grupo alemán y de acuerdo con el mapa publicado por Leister y col. (1996).

Se evaluó una segunda población de referencia de *S. tuberosum* correspondiente al mapa ultra denso de papa (UHD: *Ultra High Density Map*, <http://www.dpw.wageningen-ur.nl/uhd>) provista por el Dr. E. Ritter (NEIKER-Tecnalia, España) consistente en los dos parentales del cruzamiento (RH y SH) y 90 individuos progenie, disponible como ADN. El análisis de marcador RGA(584) como SCAR sobre esta población no reveló polimorfismo y, por lo tanto, no fue posible su mapeo en la misma.

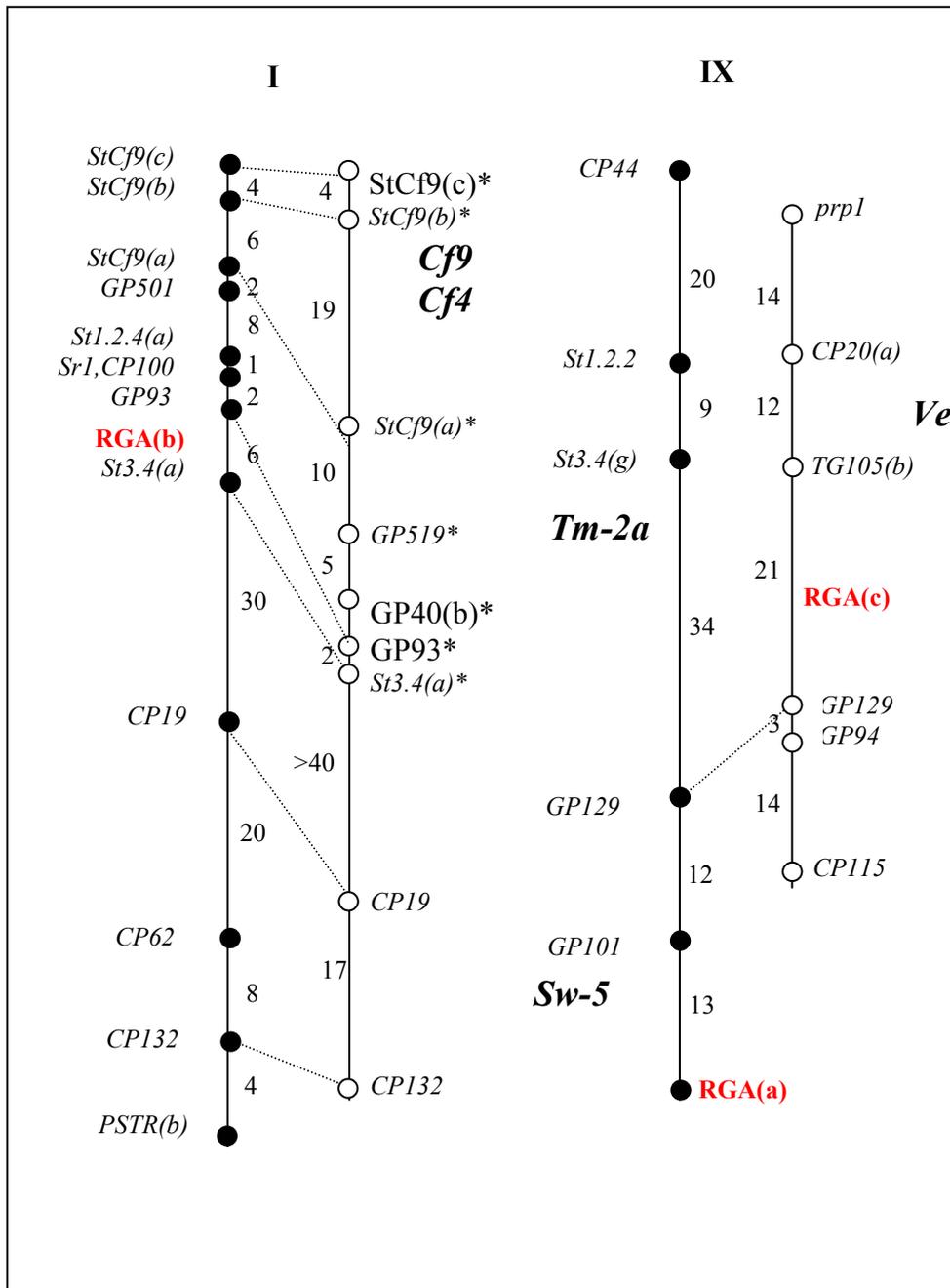


Figura 23. Representación esquemática del mapeo por RFLP del marcador RGA(584) derivado de *S. commersonii* en los cromosomas I y IX (tomado de Leister y col., 1996 y según la comunicación de la Dra. Gebhardt). Las distancias entre los *loci* marcadores están indicadas en Centimorgan. Los *loci* identificados por el marcador en estudio se muestran en rojo. GP: sondas de ADN genómico de papa, CP: sondas de cADN de papa, TG: sondas de ADN genómico de tomate. *Loci* correspondientes a genes de función conocida: *PSTR* (crom. I), repetición subtelomérica; *Sr1* (crom. I), *locus* de autoincompatibilidad; *prp1* (crom. IX), cADN relacionado a patogénesis. *St*: *loci* identificados por sondas RGA usadas por Leister y col., (1996). Los *loci* de resistencia a patógenos que fueron identificados en experimentos de mapeo independientes en tomate y papa (en negrita) se muestran en sus posiciones aproximadas en base a los marcadores de RFLP de referencia. *Loci* de resistencia a hongos: *Cf4* and *Cf9* (crom. I), resistencia a *Cladosporium fulvum*. *Loci* de resistencia a virus: *Tm-2a* (crom. I), resistencia a virus del mosaico del tabaco; *Sw-5* (crom. IX), resistencia al virus TSWV (*Tomato Spotted Wilt Virus*). *Locus* de resistencia a bacteria: *Ve* (crom. IX), resistencia a *Verticillium*.

7.13. Búsqueda de marcadores informativos adicionales a partir del mapa de microsatélites de papa

Con los datos obtenidos de localización del marcador RGA(584) en el mapa de papa, se procedió a identificar aquellos marcadores microsatélites ubicados en los cromosomas I y IX para ensayarlos en la población de *S. commersonii*, siendo éstos de utilidad para determinar la localización genómica precisa del gen de resistencia extrema *Rx_{comm}*. Se seleccionaron los microsatélites STM1029, STM1049, STM2020, STM2030 (de cromosoma I) y STM0017, STM1008, STM1017, STM1021, STM1051 (de cromosoma IX).

La colección de marcadores microsatélites fue desarrollada originalmente a partir de ADN genómico de *S. tuberosum* (Milbourne y col., 1998) y, en el caso de analizar especies silvestres como *S. commersonii*, se deben realizar ensayos de ajuste para obtener las condiciones de amplificación óptimas, siempre y cuando exista conservación evolutiva de las secuencias flanqueantes al microsatélite que sirven como templado de los iniciadores específicos. En *S. commersonii* sólo fue posible ajustar las condiciones de amplificación para los microsatélites STM1008 y STM1021 (cromosoma IX) y STM1029 (cromosoma I). Para los otros marcadores, no se obtuvieron amplificaciones positivas o se obtenían amplificaciones con un gran número de bandas, resultando en patrones complejos y difíciles de analizar comparando con el correspondiente ADN testigo de *S. tuberosum*.

La comparación de los *bulks* resistente (B2R) y susceptible (B2S) con los tres marcadores SSR STM1008, STM1021 y STM1029 no mostró alelos diferenciales entre los *bulks* y, por lo tanto, estos marcadores no estarían asociados al carácter en estudio. Finalmente, estos marcadores no fueron útiles para discernir la posición cromosómica del gen de interés.

7.14. Análisis de homólogos a genes *Rx* ya clonados

El aislamiento de secuencias homólogas a *Rx* ya clonados se realizó siguiendo la aproximación descrita en Bendahmane y col. (2000) para el clonado del gen *Rx2*. Este autor describe el empleo de una estrategia de amplificación de homólogos a *Rx1* combinada con un sistema de expresión transiente de estos homólogos en plantas de tabaco que expresaban la proteína de cápside de PVX (elicitador de la respuesta de resistencia) para aislar el gen de resistencia extrema *Rx2* (o *Rx_{acl}* proveniente de *S. acaule*). De manera similar, asumiendo una elevada conservación de secuencia entre los genes *Rx* se emplearon

los iniciadores propuestos por dicho autor, que se superponen con los codones de iniciación y terminación de la transcripción de *Rx1* (abarcando un total de 3245 pb), se realizaron reacciones de PCR tendientes a amplificar secuencias homólogas a *Rx1* presentes en *S. commersonii*.

Se realizaron reacciones de amplificación sobre los *bulks* de individuos segregantes resistentes y susceptibles (B2R y B2S) y se compararon los patrones de amplificación obtenidos mediante electroforesis en gel de agarosa: no se observaron diferencias entre los mismos, observándose cuatro bandas de amplificación claramente distinguibles (una menor a 0,5 kb; una de 1,5 kb; una de 1,6 kb y una de 3 kb aproximadamente) siendo la banda de aproximadamente 3 kb mayoritaria (**Figura 24**).

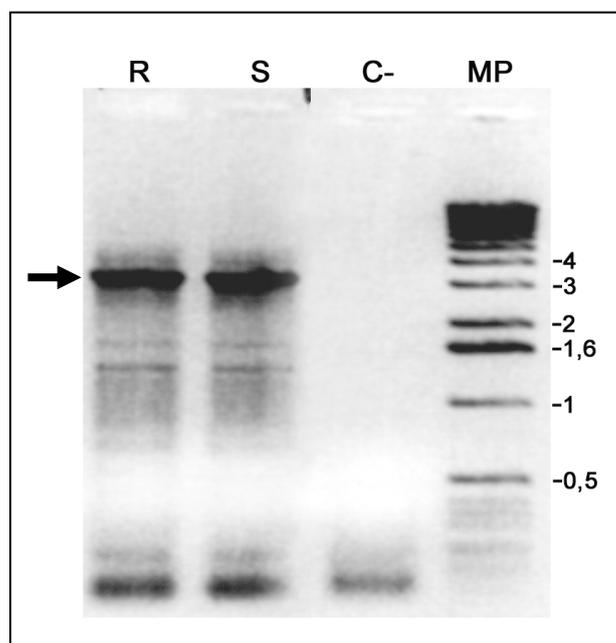


Figura 24. Producto de amplificación obtenido empleando los iniciadores P-R1 y T-R2 sobre los *bulks* de *S. commersonii* B2R (R) resistente y B2S (S) susceptible. La banda de interés se indica con una flecha. C-: control negativo de la PCR. MP: marcador de peso molecular, fragmentos en kb, 1 kb *size marker* (Invitrogen). Electroforesis en gel de agarosa 0,8%, TAE 1X teñido con BrEt.

Con el objetivo de clonar esta banda en su totalidad, se realizaron diferentes ensayos probando distintas condiciones de amplificación, diferentes vectores, distintas estrategias de ligación y transformación. Sólo se obtuvieron clones con insertos de tamaños inferiores al esperado. Finalmente, se decidió analizar un clon que contenía el inserto de mayor tamaño de aproximadamente 700 pb.

Se realizó un análisis de este fragmento, secuenciándolo en ambos sentidos empleando los iniciadores de cada extremo del vector de clonado (pGEM-T). Este análisis reveló la presencia de la secuencia de uno sólo de los iniciadores empleados (P-R1) y no de ambos.

La secuencia obtenida se comparó con bases de datos de secuencias (GenBank, EMBL, etc) empleando los algoritmos BLAST2 (*Basic Local Alignment Search Tool*, Altschul y col., 1990) disponible vía internet. Los parámetros utilizados para los análisis fueron aquellos que los portales de acceso utilizan por defecto.

Este análisis reveló una elevada similitud ($E\text{-value}=0$, Identidad >93%) con las secuencias de los genes de resistencia a PVX ya clonados ($Rx1$ y $Rx2$), al gen de resistencia a nematodos $Gpa2$ (que se encuentra en el mismo *cluster* de genes que $Rx1$ y con el cual tiene una elevada identidad) y a secuencias homólogas a dichos genes de resistencia (RGCs) que se encuentran adyacentes a estos genes formando clusters. Estas secuencias se describen en la **Tabla 9**.

Tabla 9. Listado de las secuencias obtenidas resultante del análisis comparativo con bases de datos realizado con la secuencia homóloga a Rx aislada a partir de *S. commersonii*. cds: *coding sequence*, secuencia codificante. Longitud de la secuencia: corresponde a la longitud completa de la secuencia depositada en bases de datos.

Número de Acceso al GenBank	Nombre de la Secuencia	Longitud de la secuencia (pb)
AJ011801	<i>Solanum tuberosum</i> gen rx ($Rx1$)	18284
AF265664	<i>S. tuberosum</i> cluster de genes de resistencia, secuencia completa	187352
AJ249448	<i>S. acaule</i> gen $Rx2.ac15$ para proteína NBS-LRR, exones 1-3 ($Rx2$),	3229
AF195939	<i>S. tuberosum</i> proteína de resistencia a enfermedades, gen $Gpa2$, cds completa	10331
AJ249449	<i>S. tuberosum</i> gen GPA2 para proteína NBS-LRR, exones 1-3	3254
AF266747	<i>S. tuberosum</i> gen RGC1 (RGC1), cds parcial	3146
AF266746	<i>S. tuberosum</i> pseudogen RGC3, secuencia completa	2629
AY090566	<i>S. berthaultii</i> proteína NBS-LRR, pseudogen $Rx2\text{-like}$, secuencia completa	2639
AF421895	<i>S. berthaultii</i> GPA2-like proteína NBS-LRR pseudogen, secuencia parcial	1428
AF362365	<i>S. chacoense</i> proteína NBS-LRR, proteína $Rx2\text{-like}$, (Hc1) pseudogen, secuencia parcial	1334
AF421898	<i>S. nigrum</i> GPA2-like, gen de proteína NBS-LRR, cds parcial	1432

A modo de ejemplo, se muestra en la **Figura 25** el alineamiento múltiple resultante empleando el programa ClustalW2 (Thompson y col., 1994), de una región de la secuencia obtenida con las correspondientes a la de los genes *Rx1*, *Rx2*, *Gpa2* y el homólogo RGC1.

T7	-----TGAGTT	6
giAF195939	TCTGTATTTTGC AATTTTCGCAGAGGATGAACGGATTTATGTAATAAACTTGTGAGTT	6104
AF266747.1	TCTATATTTTGC AATTTTCGCAGAGGATGAAGAGATTTATGTAATAAACTTGTGACTT	1229
AJ011801.1	TCTGTATTTTGC AATTTTCACAGAGGATGAACAGATTTCTGTAAATGAACTTGTGAGTT	13077
AJ249448.1	TCTATATTTTGC AATTTTCGCAGAGGATGAACGGATTTCTGTAACTAACTTGTGAGTT	1266
	*** **	
T7	ATTGGCTGTAGAGGGGTTTTTGAATGAAGAAGAGGGGAAAAAGCATAGAAGAGGTGGCAGA	66
giAF195939	ATGGGCCGTAGAGGGGTTTTTGAATGAAGAAGAGGGGAAAAAGCATAGAAGAGGTGGCAGA	6164
AF266747.1	ATGGGCTGTAGAGGGGTTTTTGAATGAAGAAGAGGGGAAAAAGCATAGAAGAGGTGCCAGA	1289
AJ011801.1	ATGGCCTGTAGAGGGATTTTTGAATGAAGAAGAGGGGAAAAAGCATAGAAGAGGTGGCAAC	13137
AJ249448.1	ATGGGCTGTAGAGGGGTTTTTGAATGAAGAAGAGGGGAAAAAGCATAGAAGAGGTGGCAGA	1326
	** * * ***** ***** ***** ***** **	
T7	AACATGTATAAACGAACTTGTAGATAGAAGTCTAATTTCTATCCACTATTTGAGTTTTGA	126
giAF195939	AACATGTATAAACGAACTTGTAGATAGAAGTCTAATTTCTATCCACAATGTGAGTTTTGA	6224
AF266747.1	AACATGTATAAACGAGCTTGTAGATAGAAGTCTAATTTCTATCCACAATTTGAGTTTTGA	1349
AJ011801.1	AACATGTATAAACGAACTTATAGATAGAAGCTTAAATTTTCATCCACAATTTTGTGTTTTCG	13197
AJ249448.1	AACATGTATAAACGAGCTTGTAGATAGAAGTCTAATTTCTATCCACAATTTGAGTTTTGA	1386
	***** ** * *****	
T7	TGGAACAATAGAAAGTTGTGGAATGCATGATATGACCCGTGAACTCTGTTTGAGGGAAGC	186
giAF195939	TGGGAAACACAGAGATGTGGAATGCATGATGTGACCCGTGAACTCTGTTTGAGGGAAGC	6284
AF266747.1	TGGGAAATAGAGAGATGTGAAATGCATGATGTGACCCGTGAACTCTGTTTGAGGGAAGC	1409
AJ011801.1	TGGAACAATAGAAAGTTGTGGAATGCATGATGTGACCCGTGAACTCTGTTTGAGGGAAGC	13257
AJ249448.1	TGGGAAATAGAAAGTTGTGGAATGCATGATGTGACCCGTGAACTCTGTTTGAGGGAAGC	1446
	*** ** * * ** ***** ***** ***** *****	
T7	TCGAAACATGAATTTTGTGAATGTTATCAGAGGAAAGAGTGATCAAAAATTCATGTGCACA	246
giAF195939	TCGAAACATGAATTTTGTGAATGTTATCAGAGGAAAGAGTGATCAAAAATTCATGTGCACA	6344
AF266747.1	TCGAAACATGAATTTTGTGAATGTTATCAGAGGAAATAGTGATCAAAAATTCATGTGCACA	1469
AJ011801.1	TCGAAACATGAATTTTGTGAATGTTATCAGAGGAAAGAGTGATCAAAAATTCATGTGCACA	13317
AJ249448.1	TCGAAACATGAATTTTGTAAATGTTATCAGAGGAAAGAGTGATCAAAAATTCATGTGCACA	1506
	***** ***** ***** ***** ***** **	

Figura 25. Alineamiento de secuencias nucleotídicas obtenido mediante el programa ClustalW. Se muestra una porción representativa de 246 pb del total de los 700 nt analizados.

T7: secuencia de *S. commersonii*, giAF195939: *Gpa2*, AF266747.1: RGC1, AJ011801.1: *Rx1* y AJ249448.1: *Rx2*. Los *gaps* introducidos en las secuencias se indican con guiones (-). Los nucleótidos conservados entre las cinco secuencias se indican con un asterisco (*).

7.15. Confirmación de la localización cromosómica del gen *Rx_{cm}* mediante el empleo de líneas introgresadas de tomate

En función de la elevada identidad encontrada entre la secuencia del marcador RGA(584) y las secuencias obtenidas a partir del análisis de la genoteca de BACs con genes de tomate (especie muy emparentada con la papa y con un porcentaje muy alto de sintenia con la misma), se decidió utilizar una población de referencia internacional de mapeo de tomate para corroborar la localización cromosómica del gen de resistencia extrema *Rx_{cm}*.

Para ello, se emplearon las líneas introgresadas de tomate (Eshed y Zamir, 1994) para estudiar la localización del marcador RGA(584) ligado al gen *Rx_{cmm}*.

Una “línea introgresada” (se abrevia IL por su nombre en inglés) es una línea de una especie cultivada que contiene material genético derivado de una especie similar, por ejemplo, una especie salvaje relacionada. En este caso, la colección de ILs de tomate corresponde a fragmentos cromosómicos de *S. pennellii* (especie salvaje, antes denominada *Lycopersicon pennellii*) introgresados en *S. lycopersicum* (especie cultivada, antes *L. esculentum*). La colección consta de 50 líneas, cada una conteniendo un fragmento cromosómico conocido, cubriendo los 12 cromosomas de tomate. El mapa de ILs está relacionado con el mapa de alta resolución de tomate compuesto por 1500 marcadores, contando con 614 marcadores de referencia (para detalles consultar el sitio http://www.sgn.cornell.edu/maps/pennellii_il/index.pl).

En este contexto, se solicitaron las semillas correspondientes a las ILs (número de acceso LA4028 a LA4103) y a los progenitores de las mismas al *Tomato Genetics Resource Center* (TGRC) de la Universidad de California, Davis, EUA.

Las mismas fueron sembradas en condiciones controladas de invernáculo para obtener material verde a partir del cual se realizó la extracción de ADN empleando el método de CTAB (Saghai-Marooft y col., 1994).

A partir del ADN de las líneas parentales *S. lycopersicum* y *S. pennellii* se ensayó el marcador RGA(584) en condiciones de amplificación por PCR, de tal manera de obtener fragmentos ortólogos, en lo posible únicos, para cada una. Las condiciones ensayadas (baja exigencia de homología en la reacción de PCR para permitir la hibridación de los iniciadores heterólogos) permitieron la amplificación de varios fragmentos, pero no se observó un polimorfismo seguro y reproducible en esas condiciones.

Por lo tanto, se decidió analizar el marcador RGA(584) directamente como sonda de RFLP sobre los perfiles de restricción de las líneas parentales. Para ello, se realizó una membrana de *Southern blot* correspondiente a ambas líneas tratadas con cinco enzimas de restricción diferentes (*HindIII*, *BamHI*, *EcoRI* y *EcoRV*) y se sometió a hibridación con el marcador de interés. El resultado de este análisis se observa en la **Figura 26**.

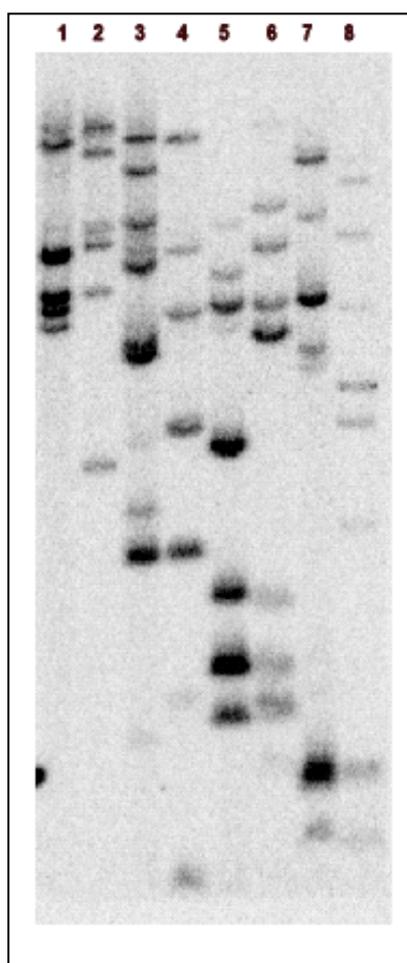


Figura 26. Análisis de RFLP empleando como sonda el marcador RGA(584). Calles impares: *S. pennellii*. Calles pares: *S. lycopersicum*. 1 y 2: *EcoRV*, 3 y 4: *HindIII*, 5 y 6: *EcoRI*, 7 y 8: *BamHI*.

Así, el perfil observado pone en evidencia que, en las condiciones ensayadas de *zooblotting* (baja exigencia de hibridación debido a que la sonda es heteróloga y de acuerdo con los resultados obtenidos anteriormente en la PCR), el marcador RGA(584) detectó polimorfismos entre las dos líneas parentales para todas las enzimas de restricción empleadas.

El marcador RGA(584) se ensayó como sonda de RFLP empleando la enzima *EcoRI* sobre 42 ILs en forma de *pools*, representativos de cada cromosoma de tomate, para determinar la localización cromosómica precisa del marcador.

De esta forma, cada uno de los 12 cromosomas de tomate se encontró representado por un conjunto de ILs:

Cromosoma 1: IL 1.1, IL 1.2, IL 1.3 e IL 1.4

Cromosoma 2: IL 2.1, IL 2.2, IL 2.3, IL 2.5 e IL 2.6

Cromosoma 3: IL 3.1, IL 3.2, IL 3.3 e IL 3.5

Cromosoma 4: IL 4.1, IL 4.3 e IL 4.4

Cromosoma 5: IL 5.1, IL 5.2, IL 5.3, IL 5.4 e IL 5.5

Cromosoma 6: IL 6.1, IL 6.2 e IL 6.3

Cromosoma 7: IL 7.2 e IL 7.4

Cromosoma 8: IL 8.1, IL 8.2 e IL 8.3

Cromosoma 9: IL 9.1, IL 9.2 e IL 9.3

Cromosoma 10: IL 10.1, IL 10.2 e IL 10.3

Cromosoma 11: IL 11.1, IL 11.2, IL 11.3 e IL 11.4

Cromosoma 12: IL 12.2, IL 12.3 e IL 12.4

Mediante esta estrategia, se analizó en las líneas progenie el polimorfismo encontrado entre los genotipos parentales, *S. lycopersicum* y *S. pennellii*, permitiendo su localización en un cromosoma particular.

El análisis de las líneas introgresadas localizó este polimorfismo en el cromosoma 9 de tomate (**Figura 27**).

Para una localización más precisa del marcador RGA(584), se analizaron de forma individual las líneas representativas de este cromosoma.

Para ello, se repitió el análisis de RFLP empleando la enzima de restricción *EcoRI* y el marcador RGA(584) como sonda marcada radiactivamente. Las líneas analizadas fueron: IL 9.1, IL 9.2 e IL 9.3. Asimismo, se incluyeron los *pooles* de las líneas de cromosoma 10, 11 y 12 como controles.

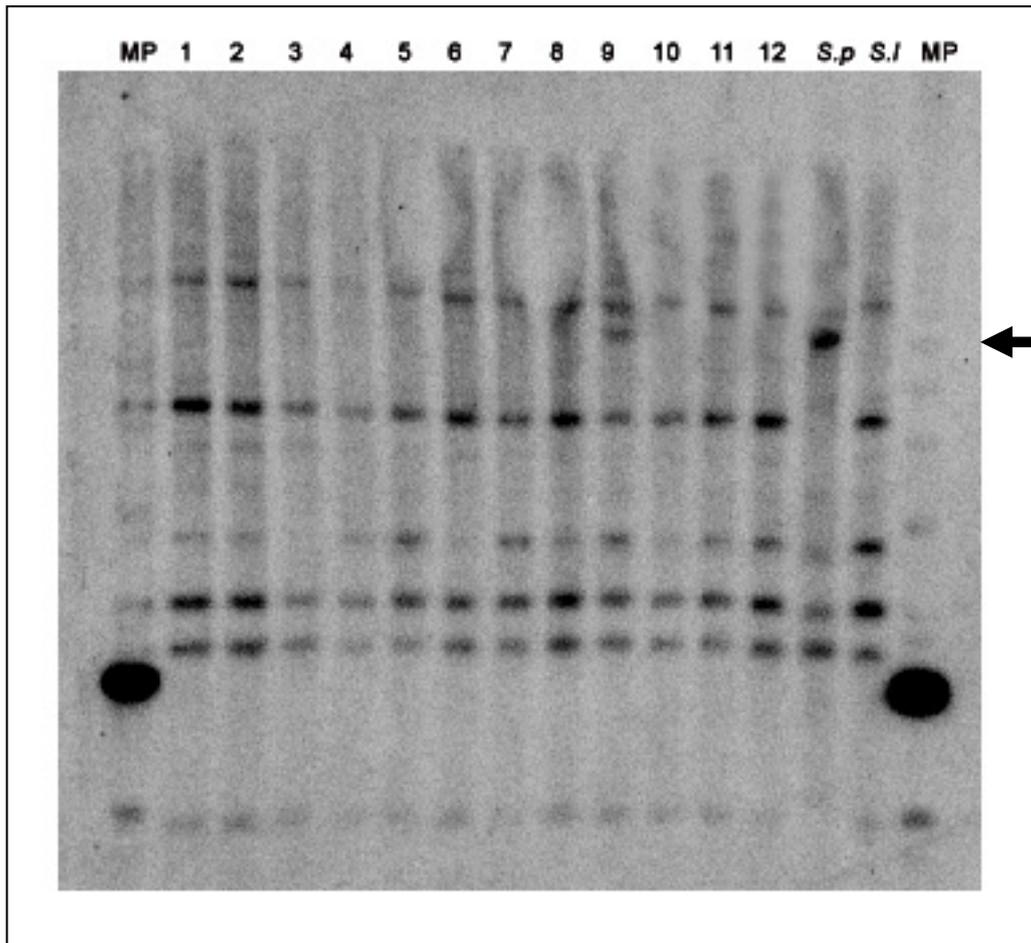


Figura 27. Identificación del cromosoma 9 como portador del alelo del marcador RGA(584) perteneciente a *S. pennellii* pariente salvaje de *S. lycopersicum*. Análisis mediante RFLP empleando la enzima de restricción *EcoRI*. El polimorfismo entre *S. pennellii* (*S.p*) y *S. lycopersicum* (*S.l*) se indica con una flecha. Calles 1 al 12: *poles* de las líneas introgresadas cada una representando la introgresión en un único cromosoma. Se muestra el conjunto completo de los 12 cromosomas de tomate. MP: marcador de peso molecular, 1 kb *size marker* (Invitrogen). Autorradiografía de RFLP obtenida con la sonda RGA(584) marcada radiactivamente.

El análisis individual de las tres líneas introgresadas representativas del cromosoma 9 de tomate, mostró que el polimorfismo estaba localizado en la IL 9.3. (**Figura 28**).

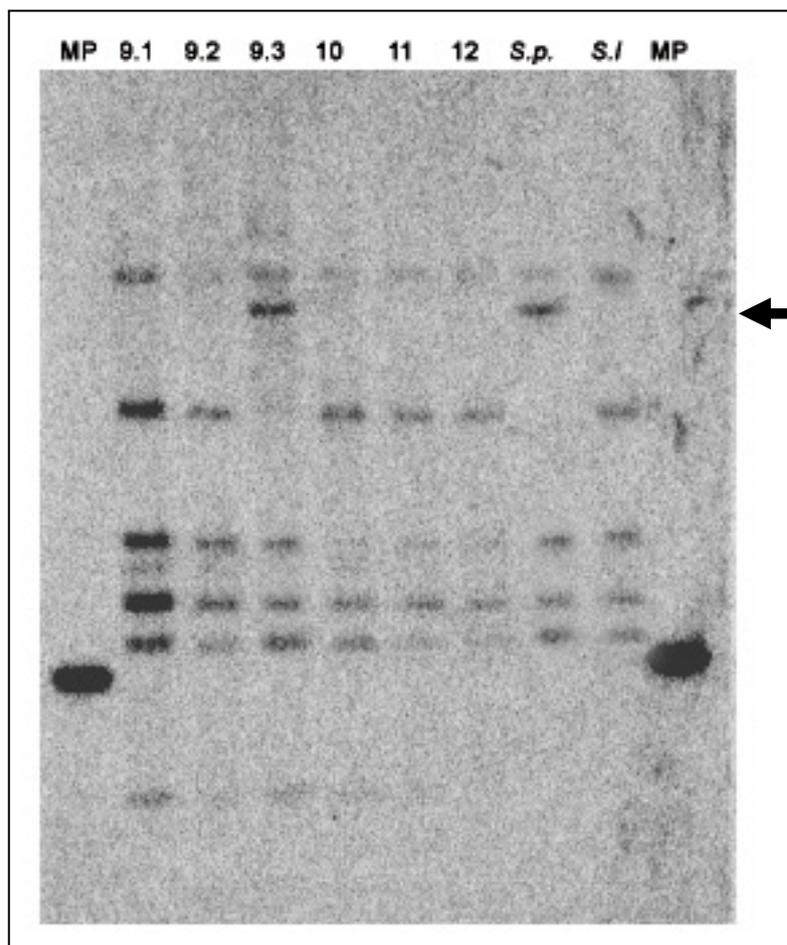


Figura 28. Identificación de la región del cromosoma 9 que porta el alelo del marcador RGA(584) perteneciente a *S. pennellii* pariente salvaje de *S. lycopersicum*. Análisis mediante RFLP empleando la enzima de restricción *EcoRI*. El polimorfismo entre *S. pennellii* (*S.p.*) y *S. lycopersicum* (*S.l.*) se indica con una flecha. Calles 9.1, 9.2 y 9.3: ILS 9.1, 9.2 y 9.3, respectivamente. Calles 10, 11 y 12: *pooles* de las líneas introgresadas correspondientes a los cromosomas 10, 11 y 12. MP: marcador de peso molecular, 1 kb *size marker* (Invitrogen). Autorradiografía de RFLP obtenidas con la sonda RGA(584) marcada radiactivamente.

Esto indica una posición de mapa para el marcador RGA(584) en la región distal del brazo largo de este cromosoma (**Figura 29**), y permite confirmar dicha posición para el gen de resistencia extrema a PVX MS presente en *S. commersonii*, *Rx_{cmm}*.

chromosome 9

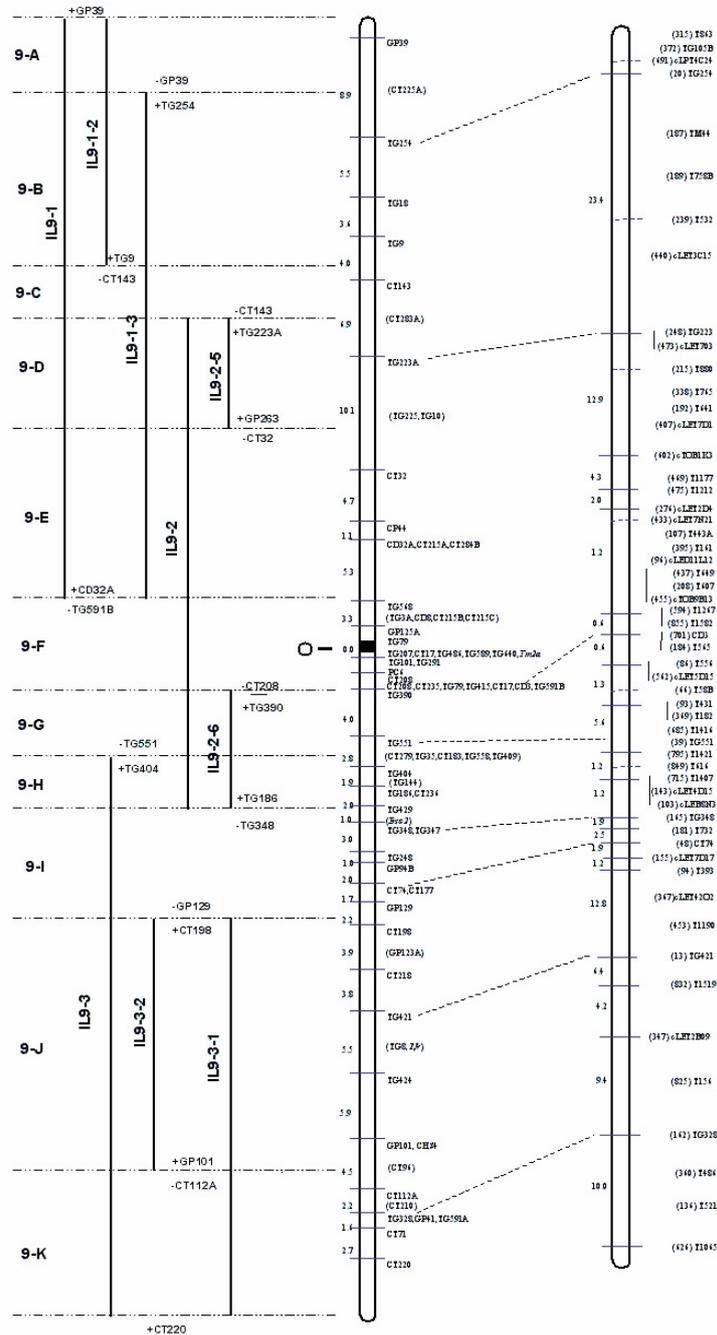


Figura 29. Mapa de referencia para el cromosoma 9 (chromosome 9). A la izquierda se muestran los segmentos correspondientes a las introgresiones de las ILs de tomate y a la derecha los mapas de referencia de marcadores moleculares. (Tomado de <http://sgn.cornell.edu/>).

7.16. Análisis de marcadores moleculares específicos de la región de interés, generados a partir de mapas o trabajos de mapeo en distintas especies de *Solanum*.

7.16.1. Análisis exploratorio de marcadores moleculares del cromosoma IX, aislados de distintas especies de *Solanum*, para la búsqueda de polimorfismo en *S. commersonii*

Ante la evidencia experimental de la localización del gen de interés en la región distal del brazo largo del cromosoma 9 (cromosoma IX en papa), se decidió ensayar distintos marcadores localizados en esta región genómica. Se analizaron marcadores de distintas clases propuestos por la literatura y/o generados a partir de bases de datos correspondientes a los mapas públicos disponibles y aprovechando la relación sinténica entre tomate y papa.

Para ello, se emplearon los ADNs de los *bulks* B1R y B1S y, en casos particulares, ADN de *S. lycopersicum* y *S. pennellii* como control.

A partir del trabajo publicado por Smilde y col. (2005) se seleccionaron los siguientes marcadores: E325111 (correspondiente a un fragmento derivado de un EST de tomate), CP110, Sw5m, T156 y TG328. Se ensayaron las condiciones de detección de polimorfismo en *S. commersonii* para dichos marcadores dado que las mismas estaban descritas para otra especie silvestre de papa (*S. mochiquense*). Se obtuvieron fragmentos de amplificación para los marcadores E325111, T156 y TG328. No se obtuvieron productos de amplificación para los marcadores Sw5m y CP110 debido a que la secuencia de los iniciadores publicada en el trabajo presentaba errores (comunicación personal con el autor).

En cuanto al marcador E325111, se amplificó en los genotipos parentales de las ILs de tomate reproduciéndose el polimorfismo descrito en el trabajo (CAPS con la enzima *AluI*). Estas condiciones se analizaron en la población de *S. commersonii* pero no permitieron detectar variación. El ensayo con otras enzimas de restricción tampoco permitió revelar polimorfismo en *S. commersonii*.

Para el caso de los marcadores T156 y TG328, fueron amplificados en *S. commersonii* pero no se detectó polimorfismo en las condiciones descriptas.

A partir del trabajo publicado por Marczewski y col. (2006) se seleccionó el marcador SC878(885) localizado en la región distal del cromosoma IX. Este marcador es de tipo SCAR, derivado de un marcador ISSR denominado UBC962. Lo interesante es que el marcador UBC962 presenta un 94% de identidad nucleotídica con la región del

cromosoma XII de *S. tuberosum* que contiene al gen *Rx1* de resistencia a PVX y un 84% de identidad con la región 5' no traducida del gen *Gpa2*, (AF195939.1) de resistencia al nematodo del quiste de papa *Globodera pallida*, el cual está física y estrechamente ligado a *Rx1*. La amplificación del marcador SC878(885) en *S. commersonii* se logró empleando condiciones de baja exigencia de anillamiento de iniciadores en la PCR, obteniendo varios productos de amplificación los cuales se comportaron como monomórficos entre los *bulks* resistente y susceptible a PVX MS.

A partir del mapa público de papa (<http://www.sgn.cornell.edu/>) se seleccionó el marcador GP101 (de tipo RFLP) localizado en la región distal del cromosoma IX para el cual se encuentra depositada la secuencia del mismo. Se diseñaron oligonucleótidos iniciadores que fueron empleados en reacciones de amplificación sobre los *pooles* de *S. commersonii* resistente y susceptible a PVX MS. El producto obtenido no mostró polimorfismo en cuanto a tamaño del fragmento. Por lo tanto, se analizó la posibilidad de encontrar sitios de restricción diferenciales mediante el empleo de las enzimas *AluI*, *MseI* y *AseI*. Esta estrategia, tampoco permitió revelar polimorfismo.

La información provista por el trabajo de Śliwka y col. (2006) permitió el análisis del marcador S1d11 derivado de la secuencia de un EST de *S. tuberosum*. Este marcador pudo ser amplificado en *S. commersonii*, *S. lycopersicum* y *S. pennellii* pero no se detectó polimorfismo.

Dado los resultados negativos obtenidos para el marcador Sw5m (Smilde y col., 2005) se decidió analizar el marcador Sw5 descrito en el trabajo de Garland y col. (2005). Se pudo obtener amplificación en *S. commersonii*, *S. lycopersicum* y *S. pennellii*. No resultó polimórfico entre los *bulks* de papa silvestre ni en tomate.

A partir del trabajo de Folkertsma y col. (1999) se ensayó el marcador 4-6JRB desarrollado a partir de la información de un clon de BACs en el cual se encontraba el gen Sw5. Este marcador produjo una amplificación pobre y no polimórfica en los *bulks* en estudio.

Finalmente, a partir de este último trabajo y de la información disponible en bases de datos de la familia *Solanaceae* (www.sgn.cornell.edu), se analizó el marcador CT220 (**Figura 29**). Este marcador fue amplificado exitosamente en *S. commersonii*, *S. lycopersicum* y *S. pennellii* presentando polimorfismo entre especies como así también entre los *bulks* resistente y susceptible a PVX MS. Este marcador SCAR resultó en un fragmento de 215 pb y de 214 pb en *S. lycopersicum* y *S. pennellii*, respectivamente. En el caso de *S. commersonii*, presentó un fragmento de amplificación de 216 pb presente en el *bulk* resistente y ausente en el susceptible (**Figura 30**).

En resumen, se seleccionaron 11 marcadores pertenecientes al cromosoma IX. Siete marcadores provienen de otras especies silvestres de papa, un marcador deriva de papa cultivada y tres marcadores se desarrollaron en tomate. Cinco marcadores son de tipo CAPS, cinco marcadores son de tipo SCAR y un marcador deriva de un EST. Para cada uno de ellos se analizaron las condiciones de amplificación y detección de polimorfismo en la población de mapeo de *S. commersonii* y, cuando correspondía, en los parentales de las ILs.

Un total de 9 marcadores se pudieron amplificar exitosamente en *S. commersonii*, adaptando a la especie silvestre en estudio las condiciones descritas para otras especies.

No obstante, sólo uno de estos marcadores se comportó como polimórfico en *S. commersonii*. Los restantes 8 no fueron de utilidad para el mapeo del carácter de interés.

Los resultados obtenidos para cada marcador se resumen en la **Tabla 10**.

Tabla 10. Análisis de marcadores de la región distal del brazo largo del cromosoma IX provenientes de trabajos publicados y de bases de datos de *Solanaceae*. nd: No determinado.

Marcador	Tipo	Fuente	Especie	Amplificación en <i>S. cmm</i>	Amplificación en tomate	Polimórfico en <i>S. cmm</i>	Polimórfico en tomate
E325111	CAPS	Smilde y col. (2005)	<i>S. mochiquense</i>	SI	SI	NO	SI
CP110	CAPS	Smilde y col. (2005)	<i>S. mochiquense</i>	NO	NO	nd	nd
Sw5m	CAPS	Smilde y col. (2005)	<i>S. mochiquense</i>	NO	NO	nd	nd
T156	CAPS	Smilde y col. (2005)	<i>S. mochiquense</i>	SI	nd	NO	nd
TG328	CAPS	Smilde y col. (2005)	<i>S. mochiquense</i>	SI	nd	NO	nd
SC878(885)	SCAR	Marczewski y col. (2006)	<i>S. gourlayi</i>	SI	nd	NO	nd
GP101	SCAR	GenBank (AJ487147)	<i>S. tuberosum</i>	SI	nd	NO	nd
S1d11	EST	Sliwka y col (2006)	<i>S. phureja</i>	SI	SI	NO	NO
CT220	SCAR	www.sgn.cornell.edu y Folkertsma y col. (1999)	<i>S. lycopersicum</i>	SI	SI	SI	SI
4-6JRB	SCAR	Folkertsma y col. (1999)	<i>S. lycopersicum</i>	SI	nd	nd	nd
Sw5	SCAR	Garland y col. (2005)	<i>S. lycopersicum</i>	SI	SI	NO	NO

7.16.2. Análisis del marcador CT220 en la población de *S. commersonii*

El marcador CT220 resultó polimórfico entre los *bulks* resistente y susceptible a PVX MS de *S. commersonii*. Se procedió a analizarlo en la población en estudio para estudiar la cosegregación entre el marcador y el carácter de interés.

Se realizaron reacciones de amplificación de PCR empleando los iniciadores específicos para el marcador CT220. Los productos obtenidos fueron resueltos en geles de poliacrilamida de alta resolución y teñidos con plata. Para *S. lycopersicum* y *S. pennellii* se obtuvieron fragmentos de 215 pb y de 214 pb, respectivamente. En el caso de *S. commersonii*, presentó un fragmento de amplificación de 216 pb presente en el *bulk* resistente y ausente en el susceptible, detectándose también una banda de 215 pb monomórfica (**Figura 30**). La segregación del marcador en individuos de la población 78 se observa en la **Figura 30**.

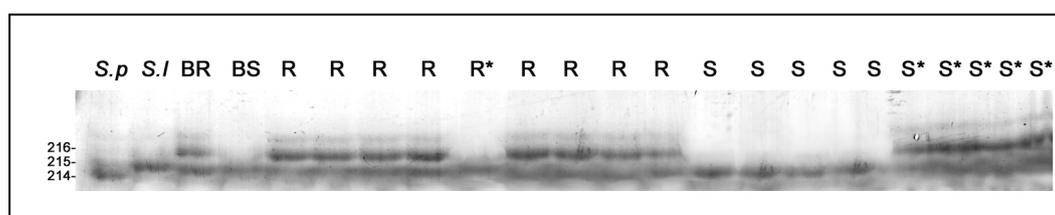


Figura 30. Perfiles de de amplificación obtenidos con el marcador CT220. Se muestran los *bulks* B1R (BR) y B1S (BS), los controles de tomate *S. pennellii* (*S.p*) y *S. lycopersicum* (*S.l*) y 19 individuos de la población 78. R: individuos resistentes. S: individuos susceptibles. Los individuos recombinantes se indican con un asterisco (*). A la izquierda se indican los tamaños de los fragmentos en pb. Electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturizante revelado mediante tinción con plata.

El análisis estadístico del marcador CT220 mostró que la segregación del carácter ajustaba a las proporciones esperadas ($\chi^2_{1R:1S}=1,2$; $p>0,05$). El comportamiento del marcador desde el punto de vista genético mendeliano presentaba cierta distorsión en la segregación debida a una sobrerrepresentación del fenotipo “presencia de banda” ($\chi^2_{1(1):1(0)}=8,53$; $p<0,05$). La prueba de independencia permitió aceptar un fenómeno de ligamiento entre el marcador CT220 y el carácter resistencia a PVX MS ($\chi^2_{1(R1):1(R0):1(S1):1(S0)}=18,26$; $p<0,05$) a una frecuencia de recombinación de 0,23.

Luego, se transformó la frecuencia de recombinación hallada en distancias de mapa empleando el programa MAPMAKER v. 3.0 (Lander y col., 1987) y la función de mapa de Kosambi (Kosambi, 1944). El marcador CT220 se encontró ligado al gen de resistencia extrema a PVX MS, Rx_{cmm} , a una distancia 23,5 cM (LOD=3).

7.17. Construcción de un mapa de ligamiento de los marcadores hallados ligados al gen de resistencia a PVX MS presente en *S. commersonii*, Rx_{cmm} , anclado en cromosoma IX

Con los marcadores ligados E38M42(500) (obtenido por la técnica de AFLP), RGA(584) y RGA s1G/as1T (obtenidos por la metodología de RGA) y CT220 (marcador SCAR); se construyó un mapa de ligamiento empleando el programa MAPMAKER v. 3.0 (Lander y col., 1987) y la función de mapa de Kosambi (Kosambi, 1944).

Se analizaron los distintos ordenamientos posibles de los marcadores para la construcción del mapa. Finalmente, se seleccionó el ordenamiento de marcadores que presentaba una probabilidad mayor ($\log\text{-likelihood}=-31,87$), la menor distancia en el largo del grupo de ligamiento obtenido (34 cM) y valores de LOD entre los distintos pares de marcadores mayor a 3.

En el ordenamiento obtenido, el marcador de AFLP E38M42(500) y el marcador CT220 flanquearon al gen Rx_{cmm} . Los dos marcadores obtenidos mediante el análisis de RGA, RGA(584) y s1G/as1T, colocalizaron (**Figura 31**).

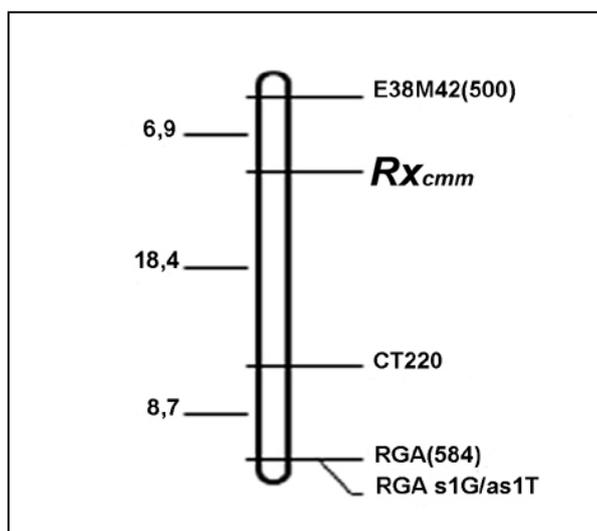


Figura 31. Mapa de la región del cromosoma IX de *S. commersonii* que contiene al gen Rx_{cmm} . A la derecha se indican los marcadores analizados y a la izquierda las distancias genéticas entre los *loci* en centimorgan (Kosambi).

8. DISCUSIÓN

La papa (*S. tuberosum*) es un cultivo de gran importancia económica a nivel mundial siendo susceptible a muchas enfermedades. Los programas de mejoramiento para conferir resistencia contra patógenos involucran la incorporación de genes a partir de especies silvestres relacionadas. Nuestro grupo identificó en el germoplasma de *S. commersonii* una nueva fuente de resistencia extrema contra todas las cepas de PVX, incluyendo las hipervirulentas HB y MS. En este trabajo de tesis se caracterizó esta nueva fuente de resistencia extrema a PVX mediante el análisis de la herencia de la misma y a través de la identificación de la región cromosómica que contiene al gen de interés, utilizando diferentes estrategias genómicas.

8.1. El análisis fenotípico

La clasificación fenotípica de los individuos pertenecientes a las tres poblaciones de *S. commersonii*, 78, 93 y 1007, se realizó mediante ELISA. Esta técnica es elegida para este tipo de estudios por su sencillez, seguridad y eficiencia. Es una técnica de rutina para el diagnóstico comercial de infecciones por PVX en los procesos de certificación de sanidad de la papa semilla y en el control cuarentenario internacional. Esta metodología fue utilizada por varios autores para la determinación del fenotipo de poblaciones en distintos trabajos de mapeo de genes de resistencia a PVX (Ritter y col., 1991; De Jong y col., 1997; Tommiska y col., 1998; Marano y col., 2002; Gebhardt y col., 2006) como así también en trabajos similares para la detección de otros genes de resistencia a virus de papa (Hämäläinen y col., 1998; Marczewski y col., 2002; Celebi-Toprak y col., 2002; Marczewski y col., 2006; Sato y col., 2006; Velásquez y col., 2007; Szajo y col., 2008). Fue aplicada en el estudio que originó el presente trabajo, el cual involucraba la búsqueda de nuevas fuentes de resistencia al PVX en el germoplasma de *Solanum* y en el cual se halló el genotipo *S. commersonii* PI 243503 que presentaba resistencia extrema a la infección por las dos razas más virulentas de PVX, HB y MS, mediante un mecanismo inducible (Tozzini, 1994 y Tozzini y col., 1994).

La técnica de ELISA se utilizó en la cuantificación de la infección por PVX en las plantas inoculadas mecánicamente. Las concentraciones de virus alcanzadas en las plantas fueron

claramente diferenciables entre un individuo susceptible y uno resistente lo que permitió clasificar con seguridad a los individuos por su fenotipo y confirmar así los resultados del trabajo de Tesis de Licenciatura previo a esta Tesis Doctoral (Martínez, 1997).

La determinación del fenotipo fue de suma importancia para aplicar la estrategia de Análisis de Grupos de Segregantes (BSA: *Bulked Segregant Analysis*) debido a que se debe tener certeza del estado del carácter en los individuos que formarán parte de cada *bulk* para poder hallar marcadores ligados al gen de interés de manera exitosa.

En este caso, donde se analiza un gen de resistencia a enfermedades, en el *bulk* susceptible no debe haber individuos que porten el alelo dominante de resistencia, esto llevaría a un fracaso en la aplicación de esta estrategia, ya que no sería posible detectar polimorfismos ligados al carácter de interés. Debido a que está reportado que esta técnica puede generar un pequeño porcentaje de falsos positivos, para evitar la contabilización del alelo de resistencia dominante en el *bulk* susceptible, se realizaron 3 o 4 infecciones independientes para cada individuo y en casos que necesitaban ser reconfirmados, se llegaron a realizar hasta 5 análisis independientes (Martínez, 1997).

8.2. Segregación de la resistencia al PVX MS

Se estudió la segregación de la resistencia extrema al PVX MS en las tres poblaciones de *S. commersonii* disponibles denominadas 78, 93 y 1007. Este análisis ajustó a una proporción 1:1, lo que indica que la resistencia al PVX MS es controlada por un gen único y dominante al que se denominó Rx_{cmm} , de acuerdo con la nomenclatura propuesta por Valkonen (1996).

La confirmación de la naturaleza monogénica de esta resistencia extrema a todas las razas de PVX, incluyendo las de mayor virulencia como las HB y MS, la hace sumamente atractiva para su incorporación en programas de mejoramiento y para posible clonado mediante la obtención de marcadores moleculares. Parrela y Cardi (1999), basados en parte en la información incluida en esta Tesis y confirmando lo observado por nuestro grupo, reportaron la transferencia de este nuevo gen de resistencia extrema a PVX desde *S. commersonii* a *S. tuberosum* a través de hibridación somática por fusión de protoplastos y plantearon la alta factibilidad de cruzar el híbrido somático obtenido ($2n=4x=48$) con los cultivares comerciales de papa ($2n=4x=48$). Sin embargo, este grupo no continuó trabajando en este tema.

A partir del análisis fenotípico, se determinó que el parental resistente de las tres poblaciones era heterocigota, mientras que los parentales susceptibles eran homocigotas.

El análisis de segregación de la resistencia a PVX MS permitió clasificar a los individuos segregantes en dos clases genotípicas: heterocigota resistente (Rr) y homocigota susceptible (rr) para las tres poblaciones.

Finalmente, se empleó a la población 78 para la estrategia de BSA, disponiendo de las otras dos poblaciones como material complementario confirmatorio.

Los *bulks* resistentes y susceptibles se formaron con ADN de individuos heterocigotas (Rr) y homocigotas (rr), respectivamente, esperando encontrar marcadores ligados sólo en fase de acoplamiento al gen de resistencia. Cuando los *bulks* contrastantes para el carácter están formados cada uno por homocigotas RR y rr , respectivamente se pueden detectar marcadores ligados en fase de repulsión. Hallar este tipo de marcadores puede ser interesante cuando se desea seleccionar en forma negativa los individuos susceptibles en un trabajo de mejoramiento, sin necesidad de realizar un ensayo biológico o en casos de estudios de genes de resistencia recesiva (Ruffel y col., 2002; Díaz-Pendón y col., 2004).

La característica “heterocigota” del *bulk* resistente pone de manifiesto la presencia del alelo dominante en un 50%, en comparación con un *bulk* formado por homocigotas RR donde su presencia sería del 100%. No obstante, como fue demostrado por Michelmore y col. (1991), esto es suficiente para detectar marcadores polimórficos entre los *bulks* ligados a la resistencia.

8.3. Análisis de segregantes agrupados (BSA) empleando marcadores ligados a otros genes de resistencia a PVX ya mapeados.

A partir de la información disponible respecto a otros genes de resistencia a PVX ya localizados cromosómicamente y al elevado nivel de sintenia en el género *Solanum* (Gebhardt y col. 1991; Tanksley y col., 1992; Grube y col., 2000) se analizaron marcadores ligados a los mismos. Esto permitió determinar si el gen de resistencia extrema a PVX presente en *S. commersonii*, Rx_{cmm} , colocalizaba con alguno de los genes de resistencia a PVX ya caracterizados siendo, potencialmente, un alelo de éstos. Esta estrategia fue empleada exitosamente en otros trabajos en solanáceas con objetivos similares (Tommiska y col. 1998; Grube y col., 2000).

A partir de los genes de resistencia extrema $Rx1$ y $Rx2$ localizados en cromosoma XII y V, respectivamente (Ritter y col. 1991), se analizaron los marcadores de tipo RFLP GP21

(cromosoma V), GP34, CP60, CP66, (cromosoma XII) sobre el ADN de los *bulks* B2R y B2S. El análisis de los marcadores tipo CAPS SPUD237 y GP21 asociados al gen de resistencia hipersensible al PVX, *Nb*, localizado en cromosoma V (De Jong y col., 1997) se realizó de acuerdo con las condiciones descritas en el trabajo original como así también empleando otras enzimas de restricción para analizar exhaustivamente posible variaciones en la secuencia obtenida entre los *bulks* de *S. commersonii*.

Tanto el empleo de los marcadores RFLP ligados a los genes de resistencia extrema *Rx1* y *Rx2* como los marcadores CAPS ligados al gen de resistencia hipersensible *Nb*, resultaron monomórficos entre los *bulks* resistente y susceptible, poniendo en evidencia que la localización cromosómica del gen de *Rx_{cm}* presente en *S. commersonii* es diferente a la de los otros genes de resistencia a PVX, *Rx1*, *Rx2* y *Nb*.

8.4. Análisis de grupos de segregantes (BSA) con marcadores RAPD

La búsqueda de marcadores ligados al gen de resistencia a PVX, *Rx_{cm}*, mediante BSA se inició empleando la técnica de RAPD. Esta metodología en *S. commersonii* fue puesta a punto en un trabajo previo (Martínez, 1997).

Esta técnica resultó ser sumamente atractiva debido a que es rápida, simple y requiere poco equipamiento experimental (un termociclador, una fuente y una cuba para electroforesis de geles de agarosa). No involucra pasos de transferencia a membranas ni hibridación con sondas de ADN (como ocurre con los RFLP) ni información para diseñar el iniciador para la PCR. Se requiere poca cantidad de ADN y se pueden analizar varias muestras por día. Los polimorfismos se detectan como presencia o ausencia de bandas en un gel, fácilmente visualizables por tinción con bromuro de etidio. Sin embargo, posee ciertas limitaciones que están dadas principalmente por la baja reproducibilidad y porque son dominantes (es decir, no es posible distinguir los heterocigotas).

Desde sus inicios, la técnica de RAPD, combinada con la estrategia de BSA, es muy usada en la rápida identificación de marcadores ligados a *loci* de interés, en particular a genes de resistencia a enfermedades causadas por fitopatógenos en diferentes especies cultivadas (Michelmore y col., 1991; de Vries y col., 1992; Miklas y col., 1993; van der Beek y col., 1994; Chagué y col., 1996; Marczewski y col. 1998; Sliwka y col. 2006; Sato y col., 2006; Kim y col., 2007; Lima y col., 2007).

En el presente trabajo, el análisis con los 270 iniciadores que mostraron amplificación positiva no reveló marcadores RAPD que estuvieran ligados al carácter en estudio. Esto nos lleva a considerar distintas hipótesis para explicar estos resultados:

1) Un bajo número de iniciadores ensayados. Con lo cual, no sería suficiente el número de *loci* analizados (1.400) como para poder detectar polimorfismos. Esto podría ser descartado considerando otros trabajos que, utilizando esta estrategia y un número similar de *loci* estudiados, fueron suficientes para detectar 1 a 3 marcadores ligados (Michelmore y col., 1991; de Vries y col., 1992; Miklas y col., 1993; van der Beek y col., 1994; Chagú y col., 1996; Sliwka y col. 2006). De cualquier modo, en estos trabajos se estudiaban *bulks* formados a partir de poblaciones con otras características y en otros cultivos. Por lo tanto, sus resultados no serían del todo extrapolables al presente estudio.

2) *S. commersonii* presenta un bajo nivel de polimorfismo. Esto fue observado con anterioridad mediante RFLP y AFLP por nuestro grupo de trabajo (Marcucci Poltri, 1998).

3) Debido a la autoincompatibilidad de las especies diploides del género *Solanum*, se trabajó con la primera generación de individuos, desconociéndose el grado de parentesco entre las líneas que se cruzaron. Si los progenitores están muy emparentados, el nivel de polimorfismo de las poblaciones en estudio podría ser muy bajo (esto no se pudo verificar ya que no se contaba con los parentales de cada cruzamiento).

Estas dos últimas hipótesis serían las más aceptadas, planteándose la necesidad de aplicar una técnica más sensible que permitiera detectar el bajo nivel de polimorfismo que existiría entre los individuos y, consecuentemente, entre los *bulks*.

8.5. Análisis de grupos de segregantes (BSA) con marcadores AFLP

El agrupamiento de un gran número de individuos aumenta la probabilidad de que los dos *bulks* no difieran en otros alelos que los adyacentes al carácter de interés. Giovanni y col. (1991) sugirió que el aumento del tamaño de los *bulks* también reduciría la aparición de falsos positivos. Michelmore y col. (1991) establecen que el tamaño mínimo del *bulk* depende del tipo de marcador que está siendo utilizado (dominante o codominante) y de la clase de población empleada para generar los *bulks* (F_2 , retrocruza, cruzamiento prueba, etc.).

En este trabajo, se eligió el par de *bulks* de mayor número de individuos (*bulks* B3R y B3S, de 24 y 21 individuos respectivamente) para ser analizados mediante AFLP. Se seleccionaron estos *bulks* debido a que minimizaban los efectos individuales de cada

segregante que formaba parte del *bulk*, evidenciando un fondo genético más homogéneo, con la consiguiente disminución de la aparición de falsos positivos (Martínez, 1997).

En la búsqueda de marcadores AFLP se emplearon dos métodos diferentes para su visualización: marcación radiactiva y tinción con plata. Ambos métodos mostraron óptimos resultados en la visualización de bandas de AFLP. Se decidió utilizar la visualización por tinción con plata ya que evitaba el trabajo con altos niveles de radiactividad. De acuerdo con trabajos previos, mostró además una muy buena resolución de las bandas (Goldman y Merril, 1982; Bassam y col., 1992; Martínez, 1997).

Otra ventaja importante de esta técnica es que permite rescatar bandas directamente del gel (Cho y col., 1996). Una banda de interés puede así ser aislada y posteriormente reamplificada con la combinación de iniciadores específica que la originó. Esta banda purificada puede ser utilizada como un posible marcador SCAR o CAPS a partir del diseño de oligonucleótidos específicos, permitiendo la amplificación directa de la región cromosómica involucrada.

La técnica de AFLP requiere más equipamiento y es más laboriosa que los RAPD. No obstante, mostró ser altamente reproducible y confiable, de acuerdo con los trabajos sobre la reproducibilidad de los patrones de AFLP (Becker y col., 1995; Lin y col., 1996; Jones y col., 1997; Martínez, 1997; Meudt y Clarke, 2007).

Otra ventaja de esta técnica es el alto número de *loci* analizados por reacción (AFLP: 40 a 100 *loci*, RAPD: 2 a 9 *loci*). De esta manera, evaluando las 165 combinaciones de iniciadores, que mostraron amplificación positiva, se analizaron aproximadamente 8.250 *loci*.

Según la bibliografía, mediante AFLP se pueden hallar más marcadores polimórficos que con cualquier otro sistema de detección de marcadores basado en PCR (Zabeau y Vos, 1993; Vos y col., 1995; Meudt y Clarke, 2007), aún cuando el nivel de polimorfismo entre el material que se compara es muy bajo (Thomas y col., 1995; Blears y col., 1998; Meudt y Clarke, 2007). Así, el empleo de la técnica de AFLP combinada con la estrategia de BSA, permitió detectar un marcador ligado al gen de interés.

8.6. Un marcador AFLP ligado al gen de resistencia extrema, Rx_{cmm} , a PVX MS

Mediante la técnica de AFLP, con la combinación de iniciadores E38M42, se obtuvo un marcador ligado al gen de interés al que se denominó E38M42(500). De acuerdo a lo

esperado, este marcador resultó ligado en fase de acoplamiento al gen de resistencia. La distancia del marcador al gen Rx_{cmm} fue de 6,9 cM (LOD=8,49).

Este marcador presentó cierta distorsión en la segregación para la población 1007 analizada, probablemente por el bajo número de individuos que la componen. Este efecto se trasladó al analizar las tres poblaciones de manera conjunta. Esta desviación respecto de lo esperado no sería resultado simplemente del azar ya que se acentuó al aumentar el número de individuos. Por lo tanto, estos resultados sugerirían que este marcador podría encontrarse en una región cromosómica con segregación distorsionada, esto estaría dado por un comportamiento anormal del cromosoma aportado por el parental resistente. Considerar un efecto dado por los parentales susceptibles sería menos probable ya que éstos son diferentes en cada una de las poblaciones.

La distorsión en la segregación de marcadores es un fenómeno frecuente, y se observa en varias especies estudiadas. Se piensa que los grados de distorsión de la segregación serían resultado de la viabilidad diferencial de gametas y/o cigotos debido a la presencia de *loci* deletéreos en la región involucrada. Este fenómeno ha sido observado también en distintos cruzamientos intra e interespecíficos de papa y en otras especies de solanáceas (Bonierbale y col., 1988; Gebhardt y col., 1989 y 1991; Chetelat y deVerna, 1991; Fooland 1996; Bernacchi y Tanksley, 1997; Kuhl y col., 2001). Coincidiendo con lo observado, durante el mapeo de RFLPs en la región adyacente al gen $Rx2$, también se observaron grados de distorsión aberrantes para los marcadores estudiados (Ritter y col., 1991).

El marcador E38M42(500) no pudo ser transformado en un marcador SCAR, aún aplicando distintos métodos para aislar, clonar y secuenciar el mismo. Esto no es infrecuente para el caso de los marcadores de AFLP, los cuales se aíslan de geles de alta resolución donde la masa efectiva del fragmento de interés es muy baja, existiendo lo que se conoce como bandas “recalcitrantes” al clonado (comunicación personal con distintos autores) si bien se han reportado nuevos métodos que intentarían superar estas limitaciones (Brugmans y col., 2003).

Mediante el empleo del método radiactivo, se pudo inferir que el marcador E38M42(500) poseía al menos un extremo *EcoRI*.

El mapa ultradenso de marcadores AFLP de papa disponible públicamente es una poderosa herramienta para referenciar marcadores hallados a partir de otros estudios (Roupe van der Voort y col., 1997a; van Os y col., 2006). Esta estrategia de empleo de marcadores de AFLP alelo específicos que comigran, para alinear diferentes genotipos de papa cultivada fue empleada exitosamente en varios trabajos de mapeo de genes de resistencia a

fitopatógenos (Roupe van der Voort y col., 1997b; Bradshaw y col. 2004 y 2006; Caromel y col., 2005; Brugmans y col., 2006; Velásquez y col., 2007).

El marcador de AFLP E38M42(500) ligado al gen de interés, no se pudo referenciar a este mapa, debido a que no fue analizada esta combinación de iniciadores en la generación del mismo (Roupe van der Voort y col., 1998; <http://www.spg.wau.nl/pv/aflp/catalog.htm>). Por lo tanto, no pudo obtenerse información adicional respecto a la localización cromosómica, que hubiera sido de utilidad para el mapeo del gen de resistencia extrema, *Rx_{cmm}*, a PVX MS.

8.7. Análisis de grupos de segregantes (BSA) mediante RGAs

La hipótesis de trabajo fue que si el gen de resistencia pertenecía a una familia multigénica de RGAs, el análisis de marcadores polimórficos conteniendo estas secuencias conservadas permitiría detectar eventualmente al gen de resistencia o, más probablemente, a otros marcadores estrechamente ligados por pertenecer al mismo *locus* complejo (*cluster* de genes de la misma familia multigénica), dado que el número total de *loci* complejos de tipo RGA por genoma no debería ser extremadamente alto.

Mediante el empleo de los iniciadores diseñados por Leister y col. (1996) sobre las secuencias peptídicas conservadas del motivo GLPL del dominio NBS de los genes *RPS2* de *A. thaliana* y *N* de *N. tabacum* se obtuvieron productos de amplificación en *S. commersonii*. Los fragmentos obtenidos estuvieron dentro del rango de tamaño según lo reportado en el trabajo realizado en papa (Leister y col., 1996). Al emplear electroforesis en geles de alta resolución, se pudo observar un número de fragmentos mayor (más de 50) coincidiendo con lo reportado por Chen y col. (1998) empleando una aproximación similar en arroz, cebada y trigo.

Dada la complejidad de los perfiles obtenidos, se evitó usar los iniciadores que contenían inosinas y se decidió modificar los iniciadores *s1* y *as1* mediante el agregado de una base extra en 3' con el objetivo de reducir el número de bandas a obtener mediante electroforesis de alta resolución. La amplificación con estos iniciadores mostró patrones diferentes con respecto a los obtenidos con los iniciadores originales y, llamativamente, sin la reducción esperada en el número de fragmentos. Por otra parte, el perfil de amplificación difirió considerablemente entre las distintas combinaciones de iniciadores, teniendo en cuenta las mínimas variaciones a nivel de secuencia que presentaban entre sí. Este resultado también fue observado por Chen y col. (1998), no encontrando correlación entre

el número de bandas amplificadas entre distintos iniciadores de RGA y el nivel de polimorfismo detectado, incluso entre las distintas especies analizadas por este grupo. Este resultado concuerda con lo propuesto por Leister y col. (1996), sugiriendo que pequeñas variaciones en la secuencia de los iniciadores y/o en las combinaciones de los mismos producirían un mayor número de fragmentos que serían partes potenciales de genes de resistencia y denotarían una abundancia mayor a la esperada de esta clase de secuencias en los genomas de plantas.

Por otra parte, este resultado pone de manifiesto que los productos amplificados mediante PCR empleando los iniciadores de RGA son altamente heterogéneos y muestra que, comparando con la electroforesis en gel de agarosa, el empleo de electroforesis en geles de poliacrilamida de alta resolución aumenta considerablemente la capacidad de detectar polimorfismos por esta metodología (Zhang y col. 2004). La estrategia de resolución de fragmentos mediante electroforesis en geles de poliacrilamida es similar a la empleada por Welsh y McClelland (1990, 1991) para la detección de productos de PCR amplificados con iniciadores arbitrarios e iniciadores consenso de genes ribosomales. No obstante, comparado con el empleo de iniciadores arbitrarios, el análisis mediante RGA es altamente reproducible debido al uso de oligonuclótidos más largos. Otra ventaja es que estos RGAs amplificados podrían estar correlacionados con funciones biológicas, representando potenciales genes de resistencia.

Actualmente, más de 50 genes de resistencia fueron clonados a partir de una gran variedad de especies de plantas. Estos genes comparten dominios conservados discretos, y estos dominios son explotados para el diseño de nuevos iniciadores degenerados para amplificar RGA y, por otra parte, para analizar bases de EST para recuperar secuencias con similitud a genes de resistencia (Kanazin y col. 1996; Graham y col., 2000; Dilbirligi y Gill 2003; Hunger y col., 2003; Madsen y col. 2003; Meyers y col. 2003; Rossi y col. 2003; Monosi y col. 2004; Xiao y col. 2006). De esta forma, debido a la disminución en los costos de secuenciación, la caracterización de RGAs a partir de la amplificación, clonado y posterior secuenciación de los productos de PCR obtenidos (sin realizar un trabajo de búsqueda de polimorfismo previo) es una aproximación experimental común para identificar marcadores de interés en varias especies de plantas como *Arabidopsis*, maíz, arroz y *S. caripense*, entre otras (Botella y col., 1997; Collins y col., 1998 y 2001; Wang y col. 2001; Trognitz y Trognitz, 2005). Estas secuencias de RGA son luego utilizadas para diseñar marcadores de tipo SCAR o CAPS que son posteriormente evaluados en poblaciones para el mapeo de genes o QTLs de resistencia de interés (Pajerowska y col. 2005; Xiao y col.

2007). En ciertos casos, a pesar de realizarse todo un desarrollo y caracterización de RGAs éstos no resultan útiles para detectar polimorfismos asociados a la resistencia, como por ejemplo el reportado en *S. caripense* y la resistencia a tizón tardío (Trognitz y Trognitz, 2005).

En este trabajo, realizando modificaciones sobre la metodología original, fue posible obtener dos marcadores de tipo RGA ligados al gen de interés.

8.8. Dos marcadores RGA ligados al gen de resistencia extrema a PVX Rx_{cmm}

Se obtuvieron dos marcadores ligados al gen Rx_{cmm} mediante los nuevos iniciadores generados durante este trabajo (con una base extra en 3', respecto a los diseñados por Leister y col., 1996). Estos marcadores ligados se obtuvieron con las combinaciones de iniciadores s1+A/as1+T y s1+G/as1+T. Como se esperaba, ambos marcadores se encontraron ligados al gen de resistencia en fase de acoplamiento a una distancia genética de 23,6 cM (LOD=3) y 21,3 cM (LOD=3,35), respectivamente.

El fragmento de aproximadamente 600 pb obtenido con la combinación de iniciadores s1+A/as1+T se clonó a partir del gel de poliacrilamida teñido con plata. Esto no ocurrió con el segundo marcador de RGA debido, probablemente, a las limitaciones que se describieron anteriormente para el caso del fragmento de interés de AFLP. En ese sentido, el marcador de 600 pb (s1+A/as1+T) consistía en un fragmento sumamente nítido e intenso, mientras que para el marcador de 400 pb (s1+G/as1+T), la banda correspondiente era difusa y con baja intensidad. En este último caso fue evidente el efecto de la masa del marcador para el éxito en el clonado.

En cuanto a la cantidad de marcadores ligados al gen de interés, la estrategia de análisis mediante RGA en geles de poliacrilamida de alta resolución mostró ser más ventajosa para evaluar a nivel genómico la resistencia comparando con los marcadores anónimos empleados anteriormente. En este sentido, para el caso de AFLP, analizando un total de 8.250 *loci* se obtuvo un marcador ligado al gen Rx_{cmm} mientras que para el caso de RGA se obtuvieron 2 marcadores asociados al gen de interés analizando unos 800 *loci*. Esto confirma la elevada eficiencia del análisis empleando RGAs tanto para la detección de marcadores ligados a genes (y QTLs) de resistencia a enfermedades en plantas como para la generación de genes candidatos (Leister y col., 1996; Kanazin y col., 1996; Hämäläinen y col., 1998; Kasai y col., 2000; Marczewski y col., 2001; Pflieger y col. 2001; Ramalingam y col., 2003; Song y col., 2003; Bormann y col., 2004, Zhang y col. 2004).

8.9. Análisis mediante marcadores AFLP-RGA

Se ensayó la metodología de AFLP-RGA (Hayes y Saghai-Marroof, 2000) en la cual se realiza todo el protocolo de AFLP pero en el paso de amplificación final, en lugar de dos iniciadores +3 (*EcoRI/MseI*), se emplea un iniciador de AFLP (en general, los derivados del sitio *EcoRI*) con un iniciador de RGA. Ante los resultados obtenidos en el análisis de RGAs, esta metodología fue levemente modificada empleando los iniciadores RGA+1 y realizando la visualización de los fragmentos obtenidos mediante tinción con plata (en lugar de empleo de iniciadores marcados radiactivamente). Esta metodología, permite combinar las ventajas de los AFLPs en cuanto a la generación de un gran número de fragmentos con la amplificación de potenciales sitios del genoma que presentan genes de resistencia a fitopatógenos. De esta forma, se incorpora información a nivel de secuencia en el perfil de marcadores “anónimos” de AFLP. En cuanto a las características metodológicas, éstas son similares a las de los AFLP, incluyendo la potencialidad de aislar específicamente fragmentos de interés directamente a partir de los geles obtenidos.

Mediante la técnica de AFLP-RGA se obtuvieron 40 bandas en promedio por cada combinación de iniciadores, concordante con lo reportado en la literatura (Hayes y Saghai-Marroof, 2000; Zhang y col., 2007).

Con las 8 combinaciones de iniciadores se analizaron 320 *loci* detectando bandas polimórficas entre los *bulks* que no se encontraron asociadas al carácter de interés. Esto probablemente se debió a las características de la población en estudio, la cual presentaría un bajo nivel de polimorfismo. Pero no puede descartarse la posibilidad de haber analizado un número no suficientemente alto de *loci* en el genoma.

Hayes y Saghai-Marroof (2000), analizaron 16 combinaciones de iniciadores obteniendo un promedio de 60 bandas por combinación e identificaron 4 marcadores ligados al gen *Rsv1* de resistencia al virus del mosaico de la soja (SMV) en el análisis de una población de dicha especie. Demostraron que la secuencia de los 4 marcadores analizados presentaban la secuencia correspondiente al iniciador de RGA empleado e identidad con otros RGAs aislados de soja (Yu y col., 1996). Recientemente, este procedimiento de AFLP-RGA fue reportado exitosamente para el mapeo de genes de resistencia en pimiento y lupín (Egea-Gilabert y col. 2003; You y col. 2005) y para aislar marcadores con homología a genes de resistencia en maíz (Xiao y col. 2006).

Cabe destacar que al momento de evaluar esta metodología, la misma no había sido aún reportada en la literatura. Desafortunadamente, dado que en nuestro caso no se obtuvieron

marcadores asociados a la resistencia, no pudo demostrarse su utilidad para detectar marcadores ligados a genes de resistencia a enfermedades y, por lo tanto, no fue aceptada la publicación de estos resultados.

Recientemente, Zhang y col. (2007) analizando distintas especies de algodón comparan esta metodología con la de AFLP y RGA, demostrando que el nivel de polimorfismo detectado es comparable al de AFLP mientras que el análisis mediante RGA tiene un nivel de discriminación significativamente menor. En nuestras manos, en cuanto a nivel de polimorfismo detectado, podemos decir que fue semejante al de AFLP concordando con estos resultados.

En cuanto a detección de marcadores útiles, la metodología de RGA fue la más eficiente (RGA: 2 polimorfismo ligado en 800 *loci* analizados; AFLP: 1 polimorfismo ligado en 8.250 *loci* analizados, AFLP-RGA: 0 polimorfismo en 320 *loci* analizados, RAPD: 0 polimorfismo en 1.400 *loci* analizados).

En la literatura se reportan otros trabajos que introducen nuevas modificaciones a la metodología de AFLP-RGA. Uno de ellos, realizado en durazno, plantea el uso de iniciadores de RGA no degenerados diseñados sobre las secuencias no conservadas del dominio NBS de los genes de resistencia (Soriano y col. 2005). Otra modificación es la estrategia denominada *NBS profiling* (van der Linden y col. 2004) que involucra la digestión con una única enzima (*MseI*) en los pasos iniciales del protocolo de AFLP y que permitió la identificación de RGAs y el mapeo de genes de resistencia en manzana (Calenge y col., 2005). Finalmente, está reportada la amplificación selectiva de dominios NBS de RGAs empleando polimorfismo específico de secuencia (S-SAP, *sequence-specific polymorphism*) en *S. caripense* basado en una modificación del método de AFLP-RGA (Trognitz y Trognitz, 2005). De esta forma, se puede observar la versatilidad de la metodología de RGA y sus variantes (AFLP-RGA, *NBS-profiling*, etc) y su utilidad en el mapeo de genes de resistencia, sobre todo para aquellas especies en las cuales no se dispone de abundante información de secuencias genómicas o para las cuales no hay estudios genómicos.

8.10. Análisis del marcador RGA(584)

El marcador ligado al gen *Rx_{cm}* obtenido mediante la metodología de RGA se estudió mediante el empleo de diferentes estrategias que involucraron el análisis a nivel de su secuencia nucleotídica, el estudio de una genoteca de BAC de *S. bulbocastanum*, su

empleo como sonda de RFLP en *S. commersonnii* y su posterior localización cromosómica en una población de mapeo de referencia de papa.

El marcador RGA(584) se clonó exitosamente a partir de los geles de poliacrilamida teñidos con plata y se obtuvo su secuencia. Esta secuencia se depositó en bases de datos (Número de acceso al GenBank AF219941). Al momento de realizarse el primer análisis de búsqueda de identidad de la secuencia obtenida en las bases de datos, mostró similitud con secuencias de otros RGAs aislados de avena, arroz y trigo. La mayor identidad (82%, en aproximadamente 300 nt superpuestos) con un clon de una genoteca de BACs de tomate (AQ367206) desarrollada por el grupo del Dr. Rod Wing (CUGI *Clemson University Genomics Institute*, Clemson University, EUA). Teniendo en cuenta que tomate y papa presentan elevada similitud entre sí, esta información fue interesante pero no permitió avanzar demasiado en la caracterización del marcador (si bien se contactó al jefe del grupo para obtener información referida a la localización de este clon en el mapa de tomate).

Se realizaron nuevas comparaciones con las bases de datos de secuencias, mostrando una identidad del 90% con el gen *Sw-5* de resistencia al tospovirus TSWV (*Tomato Spotted Wilt Virus*) de tomate (AY007367.1).

El gen *Sw-5* se encuentra localizado en el brazo largo del cromosoma 9 de tomate (Stevens y col., 1992 y 1995; Chagué y col., 1996), siendo esta una primera evidencia de la posible localización del marcador RGA(584) y, por lo tanto, del gen *Rx_{cmm}*.

En el estudio de clonado posicional basado en mapa (*map based cloning*) del gen *Sw-5* no se detectaron copias adicionales en el intervalo de 150 kb del cósmido que contenía al *locus* de este gen (Brommonschenkel y Tanksley 1997). Brommonschenkel y col. (2000) basados en el aislamiento de varios ADNc de este gen y usándolos como sondas de RFLP mostraron que *Sw-5* es miembro de una familia multigénica presente en forma dispersa en cromosomas 9 y 12 de tomate. Describieron 4 homólogos a *Sw-5* que mapean en la región telomérica del cromosoma 9: tres homólogos por debajo del marcador CT220 y un homólogo que cosegrega con el marcador CT71 (a 2 cM por arriba de CT220), siendo éste el sitio homeólogo a la región del genoma de papa donde se localiza el gen de resistencia a *Globodera pallida*, *Gpa6* (van der Voort y col., 1998). Otros dos homólogos mapean en regiones centroméricas del cromosoma 9, vecinos a la región donde mapea el gen *Tm2a* de resistencia al virus TMV (*Tobacco Mosaic Virus*) en tomate (Pillen y col., 1996). Finalmente, un homólogo a *Sw-5* mapea en el cromosoma 12, cosegregando con el marcador TG360 en la misma región donde mapea el gen de resistencia a oídio (*powdery mildew*) *Lv* en tomate (Chunwongse et al. 1997) y donde se ubican en la región homeóloga

en papa los genes de resistencia a PVX *Rx1* y de resistencia a *Globodera pallida* *Gpa2* (van der Voort y col., 1999; van der Vossen y col., 2000). En otro trabajo (Spasova y col., 2001; grupo competidor al anterior) de clonado posicional del gen *Sw-5* mediante el empleo de una genoteca de BAC, describen la presencia de dos secuencias tipo *Sw-5* en el clon de BAC que contiene al marcador CT220 (*Sw-5a* y *Sw-5b*) siendo una la que confiere el carácter de resistencia y la otra un homólogo, y no descartan la posibilidad de que existan otros homólogos a este gen en otros sitios del genoma, basándose en resultados previos (Folkertsma y col., 1999).

Si bien las secuencias de los homólogos a *Sw-5* obtenidos mediante la estrategia de análisis de ADNc, no fueron depositadas en bases datos de secuencias, las evidencias encontradas por los estudios en tomate sugerirían que el marcador RGA(584) podría ser un homólogo a *Sw-5* presente en *S. commersonii* localizado en cromosoma IX. Asimismo, la localización de uno de los homólogos en cromosoma 12 en la región donde se ubica el gen *Rx1* de resistencia a PVX en papa fue un indicio más de que este marcador era importante en este trabajo para localizar al gen *Rx_{comm}*.

El gen *Sw-5* pertenece a la familia de genes de resistencia a enfermedades en plantas con estructura CC-NBS-LRR (Brommonschenkel y col., 2000; Spasova y col., 2001). El análisis de la secuencia aminoacídica del gen *Sw-5* (Brommonschenkel y col., 2000; Spasova y col., 2001) muestra que la mayor identidad (30% o 51%), la posee con el gen de resistencia a nematodos *Mi* (Milligan y col., 1998) y al gen *Prf* (35% o 43%) de resistencia a *Pseudomonas syringae* (Salmeron y col., 1994), ambos de tomate. Brommonschenkel y col. (2000) comparan la región central del NBS con la de otros genes de resistencia (*Mi*, *Prf*, *RPM1*: gen de resistencia de *A. thaliana*, Grant y col., 1995) incluyendo en el análisis la región central del NBS del gen *Rx1* (van der Voort y col., 1999) mostrando una elevada conservación de secuencia entre estos genes.

En este contexto, el marcador RGA(584), si bien no se localiza estrechamente ligado al gen *Rx_{comm}*, revelaría la presencia de un *locus* complejo (*cluster* de genes) de resistencia a fitopatógenos, donde podría estar ubicado el gen de interés.

En la comparación a nivel de secuencia del marcador RGA(584) también se obtuvo una elevada identidad (86-88%) con secuencias de tipo ESTs de papa y tomate aislados de distintas colecciones de ESTs para estudios de respuesta a distintos estreses (Papa: EST617360, EST495256, EST614292 y TC130183; Números de acceso al GenBank BQ509945.2, BG596578.1, 506877.2 y UP/Q941Q8, respectivamente; Tomate: EST341354, Número de Acceso al GenBank AW979731.1). Esto indicaría que el

marcador se localizaría en una región del genoma transcripcionalmente activa y con presencia de genes funcionales o que dicho marcador podría corresponder a un gen funcional.

Paralelamente, se realizó un análisis exploratorio de una genoteca de BAC de *S. bulbocastanum* (Song y col., 2000) disponible comercialmente. Si bien no está reportado en la literatura la caracterización de *S. bulbocastanum* en cuanto a su resistencia a PVX, se decidió evaluar el marcador RGA(584) para analizar la capacidad del mismo en la detección de clones de interés y familiarizarse con las metodologías de estudio de una genoteca de grandes insertos.

Se analizaron distintas estrategias de selección de clones (ver 7.11.2.) que resultaron en una identificación inicial de 70 clones positivos. Este resultado fue el esperado considerando la representatividad de la genoteca (3,57X) y las condiciones poco exigentes de selección debido al empleo de una sonda heteróloga. Finalmente, se seleccionaron 14 clones positivos por hibridación y/o PCR debido a que no se encontró correlación entre intensidad de la señal de hibridación empleando el RGA584 como sonda con la señal de amplificación obtenida mediante PCR con iniciadores específicos para dicho marcador. Esto indicaría que ambas estrategias de análisis pueden ser complementarias y no necesariamente excluyentes. El tamaño de insertos obtenido para estos clones estuvo de acuerdo con el tamaño teórico esperado, descripto para esta genoteca.

Sobre estos clones, se realizó una amplificación por PCR empleando el marcador RGA(584) para obtener los fragmentos que luego se purificaron, se secuenciaron y se analizaron las secuencias obtenidas.

Estas secuencias mostraron alta identidad (90%) con el gen *Sw-5* de tomate (AY007367.1) de acuerdo con los resultados de identidad del marcador RGA(584).

Se obtuvo también una elevada identidad (mayor al 90%) con dos RGAs aislados de tomate silvestre *Lycopersicon hirsutum* (rebautizado *Solanum habrochaites*) denominados SS14 y SS20 (Número de acceso al GenBank AF534312 y AF534305, respectivamente) (Niño-Liu y col., 2003).

Mediante el análisis bioinformático, se obtuvieron dos secuencias ensambladas (*contigs*) con 3 secuencias cada uno, y un *contig* con 5 secuencias, representativos de 11 secuencias y tres secuencias restantes quedaron como secuencias únicas (*singletons*). Este resultado indicaría la presencia de distintas copias de la secuencia de interés y de clones de secuencia relacionada, que podrían corresponder a un mismo *locus* en el genoma.

El alineamiento de estas secuencias conjuntamente con las secuencias RGA(584) de *S. commersonii* (AF219941), el gen *Sw-5* de tomate (AY007367.1) y los dos RGAs aislados de tomate silvestre que mostraron alta similitud SS14 (AF534312) y SS20 (AF534305); mostró una elevada conservación a nivel nucleótidos entre las 12 secuencias estudiadas.

Estas secuencias podrían tratarse de variantes alélicas u homólogos al gen *Sw-5* presentes en *S. bulbocastanum*. En pimiento (*Capsicum* spp.) también se encontraron homólogos a *Sw-5* localizados en cromosoma 9 (Jahn y col., 2000). Esta conservación en la localización de homólogos a *Sw-5* en el cromosoma 9 y de otros genes de resistencia a enfermedades en la familia *Solanaceae* ha sido reportada (Grube y col., 2000).

Como una perspectiva futura, para continuar con la caracterización de los clones aislados, se podrían enviar a secuenciar sus extremos (*BAC end sequencing*) para así contar con información adicional de los mismos.

En una comparación reciente con bases de datos, estas secuencias mostraron una elevada identidad (89%) con un clon de BAC de tomate del cromosoma 9 (Número de acceso al GenBank EU139072.1: *Solanum lycopersicum chromosome 9 clone C09HBa0226D21*): Este clon corresponde al proyecto de secuenciación completa del genoma de tomate (*The International Tomato Genome Sequencing Project, SOL genomics network*, http://www.sgn.cornell.edu/about/tomato_sequencing.pl). Esta iniciativa se lleva a cabo por un consorcio internacional en donde el cromosoma 9 está siendo secuenciado por un grupo de investigación de España. Hasta el momento se encuentra secuenciado un 42% de dicho cromosoma. En ese sentido, no podemos descartar que en un futuro cercano tengamos a disposición información adicional de esta región del genoma.

El marcador RGA(584) se analizó como sonda de RFLP para detectar polimorfismo en *S. commersonii* y luego enviarlo al grupo de la Dra. Christiane Gebhardt (*Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung*, Köln, Alemania), con el objeto de ubicarlo en un mapa de papa de referencia mediante el análisis de la población de mapeo F1840 (H82.337/49, P18 parental femenino y H80.696/4, P40 parental masculino, híbrido entre *S. tuberosum ssp. tuberosum* y *S. spegazzini*). Este mapa de papa fue el empleado por Leister y col., (1996) para localizar los primeros RGAs aislados de papa y es un mapa de referencia muy importante y ampliamente usado (Gebhardt y col., 1989 y 1991).

Mediante esta colaboración, se pudo ubicar al marcador RGA(584) en el mapa de papa detectándose tres *locus*: un *locus* mayor que mapea en el cromosoma IX, en una posición distal del mismo, y que podría ser sinténico con el gen *Sw-5*; y dos *locus* secundarios. Estos dos *loci* de menor importancia se localizan uno en el cromosoma IX (en una región

más proximal, entre los marcadores TG105(b) y GP(129)) y el otro *locus* en el cromosoma I, cercano al *locus S* y al *locus* de RGAs *St1.2.4(a)*. En ese sentido, este marcador se comportaría de la misma forma que otros marcadores RGA estudiados por el grupo de la Dra. Gebhardt, detectando una familia de genes. Esto último estaría dado por la alta conservación a nivel de secuencia de los genes involucrados en respuesta a patógenos.

Estos resultados coincidieron con la información disponible a nivel de secuencia del marcador RGA(584) y la localización del *Sw-5* y sus homólogos en tomate y pimiento, apoyando la hipótesis de que el gen *Rx_{cmmm}* se localizaría en una región distal del cromosoma IX de papa.

Analizando en mayor profundidad los genes de resistencia a enfermedades en papa presentes en cromosoma IX se encontró que en la región distal de este cromosoma se encontraba localizado el gen de resistencia de tipo hipersensible al PVX *Nx_{phu}* (Tommiska y col., 1998). Este gen proviene originariamente de *S. phureja*, una especie diploide silvestre de papa originaria de la región andina de América del Sur y empleada por los mejoradores como polinizador de la papa cultivada para inducir la generación de haploides. El gen *Nx_{phu}* fue mapeado mediante el análisis de un cruzamiento interespecífico (*S. tuberosum* x *S. phureja*) localizándose en la región distal del brazo largo del cromosoma IX cosegregando con el marcador TG424 y a 11,1 cM del marcador CT220.

En base a estos datos, se puede hipotetizar que podrían existir relaciones homeoalélicas entre el gen presente en *S. commersonii* y el gen *Nx_{phu}*. El grupo de Tommiska y col., no siguió trabajando posteriormente en el tema, con lo cual no se dispuso de información a nivel de secuencia de este gen que hubiera sido útil para amplificar homólogos en *S. commersonii* y verificar esta hipótesis.

Paralelamente, se evaluó otra población de referencia de *S. tuberosum* correspondiente al mapa ultra denso de papa (UHD: *Ultra High Density Map*, <http://www.dpw.wageningen-ur.nl/uhd>) provista por el Dr. E. Ritter (NEIKER-Tecnalia, España) consistente en los dos parentales del cruzamiento (RH y SH) y 90 individuos progenie, disponible como ADN. El análisis de marcador RGA(584) como SCAR sobre esta población no reveló polimorfismo y, por lo tanto, no fue posible su mapeo en la misma. Esto puede deberse a que los sitios de unión de los iniciadores estarían conservados entre ambos genotipos parentales, produciendo la amplificación del marcador. Si bien se realizaron estudios sobre la secuencia de los fragmentos obtenidos, los mismos no fueron concluyentes y dado que se tenía el dato del mapeo en la población de referencia anterior, no se continuó analizando esta aproximación.

8.11. Búsqueda de marcadores informativos adicionales a partir del mapa de microsatélites de papa

Los resultados obtenidos pusieron en evidencia la alta probabilidad de que el gen *Rx_{cm}* se ubicaría en la región distal del brazo largo del cromosoma IX. Esto se estudió mediante el empleo de 9 marcadores microsatélites disponibles a partir de los mapas públicos, correspondientes a los cromosoma I y IX (Milbourne y col., 1998). En total, se obtuvo amplificación en *S. commersonii* de tres marcadores microsatélites STM1008 y STM1021 (cromosoma IX) y STM1029 (cromosoma I) los cuales resultaron monomórficos entre los *bulks* resistente y susceptible. Por lo tanto, estos marcadores no fueron útiles para confirmar la localización del gen *Rx_{cm}*.

Los 6 marcadores restantes no pudieron ser amplificados en condiciones óptimas, debido probablemente a una falta de conservación evolutiva de las secuencias flanqueantes al microsatélite que sirven de sitios de unión de los iniciadores específicos. Si bien, varios de estos marcadores (STM1049, STM2030, STM1052 y STM1017, STM3012) fueron empleados para caracterizar cerca de 1000 entradas de papa cultivada con el objeto de seleccionar una colección de SSR altamente informativa para genotipificar *S. tuberosum* (Ghislain y col., 2004); es evidente que el empleo de los mismos en otras especies del género puede verse limitado. Recientemente, se aislaron marcadores SSR a partir de bases de EST de papa los cuales fueron analizados en cultivares de *S. tuberosum* incluyendo cultivares provenientes de América del Sur (Feingold y col., 2005). En ese trabajo se define una colección de 18 SSR altamente informativos sugiriendo que podrían ser usados en estudios más amplios, incluyendo el análisis de especies silvestres y estudios de diversidad. Estos SSR se evaluaron recientemente en un análisis de diversidad que incluyó varias especies silvestres (exceptuando *S. commersonii*) (Spooner y col., 2007). Por lo tanto, existiría la posibilidad de disponer de este tipo de marcadores para posteriores análisis.

8.12. Análisis de homólogos a genes *Rx* ya clonados

El aislamiento de secuencias homólogas a *Rx* ya clonados se realizó en base a la estrategia descrita en Bendahmane y col. (2000). Este autor, empleando la estrategia de amplificación de homólogos a *Rx1* combinada con un sistema de expresión transitoria de estos homólogos en plantas de tabaco que expresaban la proteína de cápside de PVX

(desencadenante o *elicitor* de la respuesta de resistencia) fue capaz de aislar el gen de resistencia extrema *Rx2* (o *Rx_{acl}* proveniente de *S. acaule*). Ambos genes se encuentran localizados en diferentes cromosomas (XII y V, respectivamente).

En este contexto, a partir de la secuencia del gen de resistencia extrema a PVX, *Rx_{adg}* o *Rx1*, proveniente *S. tuberosum* subsp. *andigena* y, debido a la conservación a nivel de secuencia de los genes de resistencia a enfermedades, se desarrolló una estrategia tendiente a la obtención de homólogos al gen *Rx* en *S. commersonii*.

Para tal fin, empleando los iniciadores propuestos por Bendahmane y col. (2000) que se superponen con los codones de iniciación y terminación de la transcripción de *Rx1* (abarcando un total de 3245 pb), se realizaron reacciones de PCR tendientes a amplificar secuencias homólogas a *Rx1* presentes en *S. commersonii*.

Una primera aproximación consistió en comparar los perfiles de amplificación obtenidos para los *bulks* resistente y susceptible. Se obtuvieron 4 bandas de amplificación que se comportaron como monomórficas. Por lo tanto, se decidió clonar y secuenciar una banda mayoritaria de aproximadamente 3 kb, de acuerdo con el tamaño esperado para los genes *Rx* descritos. Desafortunadamente, no pudo clonarse el fragmento completo obteniéndose un fragmento 700 pb que fue secuenciado. El análisis de la secuencia demostró que probablemente este fragmento podría tratarse de una secuencia parcial del fragmento de 3 kb dado que sólo se identificó uno de los iniciadores en la secuencia.

La secuencia obtenida se comparó con bases de datos. Este análisis reveló una elevada identidad nucleotídica (>93%) con las secuencias de los genes de resistencia a PVX ya clonados *Rx1* y *Rx2* (Bendahmane y col., 1999 y 2000), al gen de resistencia a nematodos *Gpa2* (van der Vossen y col., 2000) que se encuentra en el mismo *cluster* de genes que *Rx1* y con el cual tiene una elevada identidad (van der Voort, 1999) y a secuencias homólogas a dichos genes de resistencia (RGCs) que se encuentran adyacentes a estos genes formando *loci* complejos (*clusters*). Por otra parte, se obtuvo una elevada identidad con secuencias de tipo RGA (o RGL: *resistance gene like*) aisladas de especies silvestres de papa como *S. berthaultii*, *S. chacoense* y *S. nigrum* obtenidas mediante el empleo de iniciadores diseñados sobre la región LRR de los genes *Rx1/Gpa2* y el gen *Mi* (Zaitzev y col., 2002).

Mediante esta estrategia se pudo amplificar un homólogo a *Rx* presente en *S. commersonii*. Si bien no se realizó el clonado y análisis de secuencia de los demás fragmentos amplificados, esto demuestra que existirían otros homólogos a *Rx* en esta especie silvestre de papa.

Mediante una estrategia similar, Bakker y col. (2003) emplearon iniciadores basados en los motivos conservados del dominio LRR de los genes *Rx1* y *Gpa2* y aislaron 9 homólogos en papa. Todos presentaban una elevada identidad (93%-100%) con ambos genes. Estos homólogos fueron mapeados, localizándose únicamente en el *cluster* de genes del cromosoma XII donde se encuentran ubicados los genes *Rx1/Gpa2*. No encontraron evidencia de que hubiera otros homólogos a *Rx1/Gpa2* adicionales fuera del cromosoma XII. El gen *Rx2* se encuentra en cromosoma V y tiene una elevada identidad con el gen *Rx1* (97,9% para el gen completo y del 99,4% a nivel del dominio LRR) y estos autores, destacan llamativamente, que no pudieron identificar homólogos en este cromosoma (si bien esperaban que esto ocurriera). Esto indicaría que el homólogo a *Rx* hallado en *S. commersonii* no necesariamente formaría parte del *locus* que contiene al gen *Rx_{cmm}* y sugeriría que esta estrategia no es lo suficientemente efectiva como para identificar homólogos en *loci* donde probablemente se espera que estén presentes.

Es factible que las secuencias obtenidas en *S. commersonii* sean secuencias funcionales, es decir, potencialmente el gen de resistencia extrema a PVX MS. Para abordar esta hipótesis deberían hacerse otros experimentos basados en la estrategia de “genes candidatos” (*Candidate Gene Approach*, Plieger y col., 2001).

8.13. Confirmación de la localización cromosómica del gen *Rx_{cmm}* mediante el empleo de líneas introgresadas de tomate

Ante los resultados obtenidos empleando los microsatélites de cromosomas I y IX que no permitieron definir la localización del marcador RGA(584) y en función de la elevada identidad encontrada entre las secuencias ligadas de tipo RGA con genes de tomate (especie muy emparentada con la papa y con un porcentaje muy alto de sintenia), se decidió utilizar una población de referencia internacional de mapeo de tomate para corroborar la localización del marcador RGA(584).

Para ello, se emplearon las líneas introgresadas de tomate (Eshed y Zamir, 1994) para estudiar la localización del marcador RGA(584) ligado al gen *Rx_{cmm}*. Esta estrategia también fue empleada exitosamente para identificar la localización cromosómica de marcadores aislados a partir de otra especie silvestre de papa (Smilde y col., 2005).

Luego de una serie de estudios sucesivos se determinó que el polimorfismo dado por el marcador RGA(584) estaba localizado en la IL 9.3, indicando una posición de mapa para éste en la región distal del brazo largo del cromosoma 9. Dado que el marcador analizado

está ligado al gen *Rx_{cm}*, esto permitió inferir la localización para el gen de resistencia extrema a PVX MS presente en *S. commersonii* en el cromosoma IX de papa (homeólogo al cromosoma 9 de tomate). Esto confirmó las hipótesis anteriormente planteadas por: los estudios a nivel de secuencia tanto del marcador RGA(584) como de los homólogos aislados de *S. bulbocastanum*, la información de mapeo suministrada por el grupo de la Dra. Gebhardt y la localización del gen de resistencia hipersensible a PVX *Nx_{phu}*. El análisis realizado apoya la existencia de un *cluster* de genes de resistencia en la región distal de cromosoma IX de papa y de otras especies de la familia *Solanaceae*, confirmando la elevada sintenia dentro de esta familia (Grube y col., 2000).

8.14. Análisis de marcadores moleculares específicos de la región del cromosoma IX, generados a partir de mapas o trabajos de mapeo en distintas especies de *Solanum*.

Ante la evidencia experimental de la localización del gen de interés en la región distal del brazo largo del cromosoma IX, se decidió ensayar distintos marcadores localizados en esta región genómica propuestos por la literatura y/o generados a partir de bases de datos de los mapas públicos disponibles. Para ello, se emplearon los ADNs de los *bulks* B1R y B1S y, en casos particulares, ADN de *S. lycopersicum* y *S. pennellii* como control.

De esta forma, a partir del trabajo publicado por Smilde y col. (2005) se seleccionaron los siguientes marcadores: E325111 (correspondiente a un fragmento derivado de un EST de tomate), CP110, Sw5m, T156 y TG328. Se obtuvieron fragmentos de amplificación para los marcadores E325111, T156 y TG328 pero no permitieron detectar polimorfismo entre los *bulks* de *S. commersonii*. No se obtuvieron productos de amplificación para los marcadores Sw5m y CP110. Esto último debido a que la secuencia de los iniciadores publicada en el trabajo presentaba errores (comunicación personal con el autor).

A partir del trabajo publicado por Marczewski y col. (2006) se seleccionó el marcador SC878(885) localizado en la región distal del cromosoma IX. Este marcador es un marcador tipo SCAR derivado de un marcador ISSR denominado UBC962. Este marcador se localiza en una región más cercana al centrómero del cromosoma IX, alejada de la región distal de este cromosoma. Lo interesante es que el marcador UBC962 comparte una identidad de un 94% con la región del cromosoma XII de *S. tuberosum* que contiene al gen *Rx1* de resistencia a PVX y un 84% de identidad con la región 5' no traducida del gen *Gpa2*, (AF195939.1) de resistencia al nematodo del quiste de papa *Globodera pallida*, el cual está física y estrechamente ligado a *Rx1*. Si bien se pudieron obtener productos de

amplificación, no se detectaron polimorfismos entre los *bulks* resistente y susceptible. Si bien sería interesante secuenciar alguno de los fragmentos de amplificación obtenidos, esto no se realizó debido a que no se obtenía una banda mayoritaria. Si esto fuera posible, sería interesante analizar la similitud con secuencias en base de datos y la posibilidad de que sea una secuencia ortóloga con una elevada identidad con genes de resistencia a PVX ya caracterizados.

Finalmente, a partir del mapa público de papa (<http://www.sgn.cornell.edu/>) se seleccionó el marcador GP101 (de tipo RFLP) localizado en la región distal del cromosoma IX para el cual se encuentra depositada la secuencia del mismo y a partir de la misma, se diseñaron oligonucleótidos iniciadores que fueron empleados en reacciones de amplificación sobre los *pooles* de *S. commersonii* resistente y susceptible a PVX no presentando polimorfismo aún analizando distintas enzimas de restricción para evaluarlo como un marcador tipo CAPS.

La información provista por otro trabajo permitió el análisis del marcador S1d11 derivado de la secuencia de un EST de *S. tuberosum* (Śliwka y col. 2006). Este marcador pudo ser amplificado en *S. commersonii*, *S. lycopersicum* y *S. pennellii* pero no se detectó polimorfismo.

Dado los resultados negativos obtenidos para el marcador Sw5m (Smilde y col., 2005) se decidió analizar el marcador Sw5 descrito en el trabajo de Garland y col. (2005). Se pudo obtener amplificación en *S. commersonii*, *S. lycopersicum* y *S. pennellii*. No resultó polimórfico entre los *bulks* de papa silvestre ni en tomate, evidenciando que estos iniciadores estarían amplificando probablemente otros homólogos a Sw-5 no asociados a la resistencia ni relacionados con el marcador RGA(584).

A partir del trabajo de Folkertsma y col. (1999) se ensayó el marcador 4-6JRB desarrollado a partir de la información de un clon de BACs en el cual se encontraba el gen Sw-5. Este marcador produjo una amplificación pobre y no polimórfica en los *bulks* en estudio.

Finalmente, a partir de este último trabajo y de la información disponible en bases de datos de solanáceas (www.sgn.cornell.edu), se analizó el marcador CT220. Este marcador fue amplificado exitosamente en *S. commersonii*, *S. lycopersicum* y *S. pennellii* presentando polimorfismo entre especies como así también entre los *bulks* resistente y susceptible a PVX MS.

En conclusión, se seleccionaron distintos tipos de marcadores moleculares generados a partir de mapas de referencia para papa y/o tomate o de información disponible a partir de trabajos publicados de mapeo de genes en distintas especies de *Solanum*. Prácticamente

todos estos trabajos implican el mapeo de genes (o QTLs) de resistencia a enfermedades en dicho cromosoma. En total se estudiaron 11 marcadores pertenecientes al cromosoma IX. Siete marcadores provenían de otras especies silvestres de papa, un marcador derivaba de papa cultivada y tres marcadores se desarrollaron en tomate. Cinco marcadores fueron de tipo CAPS, cinco marcadores analizados fueron de tipo SCAR y un marcador deriva de un EST.

Para cada uno de ellos se analizaron las condiciones de amplificación y detección de polimorfismo en la población de mapeo de *S. commersonii* y en los parentales de las ILs.

Un total de 8 marcadores pudieron ser amplificados exitosamente en *S. commersonii*, adaptando a la especie en estudio las condiciones metodológicas descritas para otras especies.

No obstante estos marcadores no se comportaron como polimórficos en *S. commersonii*, con lo cual no fueron de utilidad para el mapeo del carácter de interés.

La falta de polimorfismo en *S. commersonii* para estos marcadores, puede deberse a un bajo nivel de variabilidad entre los individuos de la población de mapeo o a que las metodologías descritas no permiten detectar polimorfismo en esta especie silvestre y, por lo tanto, deben analizarse otras estrategias (probar otras enzimas de restricción en el caso de CAPS, secuenciar los fragmentos obtenidos, etc) para que estos marcadores sean de utilidad.

En este contexto, sólo el marcador CT220 se comportó como polimórfico. Por lo tanto, se decidió analizarlo en la población en estudio y estudiar la cosegregación entre el marcador y el carácter de interés. Así, el marcador CT220 se encontró ligado al gen Rx_{cmm} a una distancia de 23,5 cM (LOD=3), presentando cierta distorsión en la segregación debida a una sobrerrepresentación del fenotipo “presencia de banda” ($\chi^2_{1(1):1(0)}=8,53$; $p<0,05$). El marcador CT220 está estrechamente ligado al gen *Sw-5* de tomate (Stevens y col. 1995) confirmando una vez más la localización del gen Rx_{cmm} .

8.15. Mapeo del gen de resistencia extrema a PVX presente en *S. commersonii* Rx_{cmm} en cromosoma IX

El gen de resistencia extrema a PVX MS, Rx_{cmm} , se localizó en la región distal del brazo largo del cromosoma IX, flanqueado por un marcador de tipo AFLP E38M42(500) y el marcador CT220. Ambos marcadores presentaron cierta distorsión en la segregación. Esto puede deberse a que esta región está cercana al telómero donde es más frecuente este tipo

de fenómeno que ha sido reportado para este cromosoma y esta región (Gebhardt y col., 1989 y 1991; van Os y col., 2006) como así también para el caso del mapeo de los otros genes *Rx* (Ritter y col., 1989). Los marcadores de tipo RGA, colocalizaron en el mapa. La única diferencia en el análisis para ambos marcadores fue un único individuo cuyo ADN no amplificó para el marcador obtenido con los iniciadores s1G/as1T. Asimismo, ambos marcadores comparten uno de los iniciadores de RGA (el as1+T) para su amplificación y el segundo iniciador sólo tiene un nucleótido de diferencia en 3'. Por lo tanto, es probable que estén amplificando el mismo *locus*.

Por otra parte, el análisis empleando la metodología AFLP-RGA no permitió encontrar un marcador asociado, si bien podría haberse obtenido dado que de manera separada tanto la técnica de AFLP como la de RGA resultaron en marcadores informativos. De acuerdo con el mapa obtenido, estos marcadores se encuentran a ambos lados del gen *Rx_{cm}* y a una distancia considerable con lo cual se justifica la ausencia de marcadores de AFLP-RGA ligados a la resistencia.

El resultado del mapeo realizado por el grupo de la Dra. Gebhardt nos permite orientar la búsqueda hacia la región más telomérica del cromosoma IX de papa, siendo posibles dos orientaciones de para el mapa obtenido para esta zona. Por lo tanto, sería interesante poder analizar otros marcadores de esta región para definir la orientación precisa, ya sea a partir de nuevos trabajos de mapeo de genes en esta zona (Szajko y col., 2008) como también mediante el empleo de otros marcadores localizados en la región, como por ejemplo marcadores COS (http://sgn.cornell.edu/COS_markers.html).

Es importante destacar que esta región del cromosoma IX es una región con baja densidad de marcadores. Otras iniciativas tendientes a encontrar nuevos marcadores en papa, como la búsqueda de homólogos a secuencias de genes de resistencia de *Arabidopsis* para luego mapearlos en papa, no resultó en marcadores localizados en esta zona (Pajerowska y col., 2005). De la misma forma, una estrategia similar pero empleada en tomate, tampoco consiguió obtener marcadores para esta zona del cromosoma 9 (Pan y col. 2000).

El gen de resistencia *Rx_{cm}* se encuentra en una zona del genoma correspondiente a un *cluster* de genes de resistencia donde están localizados los genes y/o *loci* mayores de QTLs de resistencia a patógenos en solanáceas: *Gpa6* de resistencia a *G. pallida* en papa (Roupe van der Voort y col., 2000); *Sw-5* de resistencia al tospovirus TSWV en tomate (Brommonschenkel y Tanksley, 1997; Brommonschenkel y col., 1999), *Nx_{phu}* de resistencia hipersensible a PVX en *S. phureja* (Tommiska y col., 1998), *Rpi-moc1* de resistencia a *P. infestans* en *S. mochiquense* (Smilde y col., 2005), *Ry_{ch}* de resistencia

extrema PVY (Sato y col., 2006), *Rpi-phu1* de resistencia a *P. infestans* y *Ny-1* de resistencia hipersensible a PVY ambos provenientes de *S. phureja* (Sliwka y col., 2006; Szajo y col., 2008).

El nuevo gen de resistencia extrema Rx_{cmm} a PVX MS de *S. commersonii* se encuentra en una región genómica distinta a la descrita para los otros genes de resistencia extrema a PVX ya clonados, *Rx1* (proveniente de *S. tuberosum* subsp. *andigena*) y *Rx2* (*S. acaule*), ubicados en cromosoma XII y V de papa respectivamente. Debido a esto, se podría postular que Rx_{cmm} es un tercer gen de resistencia extrema a PVX, denominándosele *Rx3*.

Este trabajo de tesis es el primero que reporta la localización cromosómica de un gen de resistencia a virus en *S. commersonii*, especie silvestre diploide de papa de distribución mayoritariamente rioplatense.

El gen de resistencia extrema a PVX de *S. commersonii*, Rx_{cmm} , puede ser transferido a la papa cultivada a través de metodologías de mejoramiento específicas que permitan superar las diferencias de ploidías e incompatibilidades sexuales interespecíficas (Parrela y Cardí, 1999; Spooner y col. 2007). Los marcadores hallados en el presente trabajo podrían ser herramientas útiles para asistir al mejoramiento (MAS: *marker assisted selection*). Por otra parte, los estudios realizados en esta tesis sientan las bases para trabajos futuros que podrían llevar al clonado basado en mapa del gen Rx_{cmm} (*map based cloning*).

En la actualidad, los nuevos genes provenientes de especies silvestres pueden ser identificados, clonados y transferidos mediante transformación genética a las especies cultivadas. Esto evita el arrastre por ligamiento de regiones genómicas no deseadas y permite la incorporación de múltiples genes de interés simulando, para el caso de genes de resistencia a enfermedades, la variación natural de genes *R* que existen en las poblaciones silvestres. La transformación genética en papa es relativamente rápida comparado con el mejoramiento tradicional. En este contexto, el gen de resistencia extrema contra las cepas hipervirulentas de PVX identificado en *S. commersonii*, Rx_{cmm} , es un candidato importante para el mejoramiento de la papa mediante técnicas de ingeniería genética, pudiendo conferir resistencia durable contra este virus en cultivares futuros.

9. CONCLUSIONES

La resistencia extrema a PVX presente en las poblaciones de *S. commersonii* es conferida por un gen único y dominante, denominado Rx_{cmm} , de enorme importancia porque es capaz de resistir a la infección por una de las razas más virulentas de PVX, como es la MS.

Se le realizó a una población segregante para el carácter un análisis de alta densidad de saturación de marcadores que implicó el escrutinio de alrededor de 10.770 *loci* con marcadores RFLP, RAPD, AFLP, AFLP-RGA y RGA a los que deben sumarse otros marcadores moleculares adicionales derivados de genes homeólogos de otras especies de *Solanum* y la utilización de poblaciones de mapeo de referencia internacional de papa cultivada y de tomate introgresado con una especie silvestre.

Se empleó exitosamente la estrategia de análisis de grupos de segregantes (BSA) junto con las técnicas de RAPD, AFLP, RGA y AFLP-RGA para identificar marcadores moleculares ligados a esta resistencia, analizándose aproximadamente 10.770 *loci*. Mediante este estudio se pudo verificar que existen diferencias moleculares entre el segmento cromosómico que confiere resistencia presente en uno de los padres del cruzamiento con respecto a la región homóloga en el padre susceptible. Estas diferencias pudieron ser detectadas por dos de las técnicas utilizadas en este proyecto, AFLP y RGA, hallándose así tres marcadores ligados al gen Rx_{cmm} .

El análisis de *loci* adicionales a partir de ensayos empleando marcadores de otras especies de la familia *Solanaceae* contribuyó a los estudios de mapeo. En ese sentido, estos marcadores fueron útiles para descartar la localización del gen en los cromosomas I, V y XII como así también para permitir la localización del mismo en el cromosoma IX, anclando el mapa de ligamiento obtenido en dicho cromosoma.

Se aplicaron exitosamente diferentes estrategias genómicas de caracterización molecular basadas en la sintenia entre los miembros de la familia *Solanaceae* para el mapeo del gen Rx_{cmm} , que incluyeron la búsqueda de marcadores y secuencias homeólogas en genomas de especies relacionadas (*S. bulbocastanum*, *S. lycopersicum*, *S. pennellii*, *S. tuberosum*)

Se localizó un nuevo gen de resistencia extrema a PVX en el cromosoma IX de papa, siendo esta posición diferente a la reportada para los otros dos genes de resistencia extrema al PVX conocidos, pudiéndose postular que Rx_{cmm} es un tercer gen de resistencia extrema, denominándosele $Rx3$.

Los resultados obtenidos ponen de manifiesto la importancia de las especies silvestres y de los recursos genéticos en general, como reservorios de genes de importancia agronómica como es el caso de la resistencia a enfermedades.

Este gen es una nueva fuente de resistencia extrema a las cepas hipervirulentas de PVX de reciente aparición, que puede ser empleado en el mejoramiento de la papa cultivada; dado que los genes disponibles en los cultivares comerciales son superados por estas cepas y los marcadores moleculares aquí descritos pueden ser de utilidad en la selección asistida.

Lic. María Carolina Martínez



Dr. H. Esteban Hopp

10. BIBLIOGRAFÍA

- Aarts MG, te Lintel Hekkert B, Holub EB, Beynon JL, Stiekema WJ, Pereira A.** (1998). Identification of R-gene homologous DNA fragments genetically linked to disease resistance loci in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Plant Microbe Interact*, 11(4):251-258.
- Adams SE, Jones RAC, Coutts RHA.** (1984). Occurrence of resistance-breaking strains of potato virus X in potato stocks in England and Wales. *Plant Pathology*, 3: 435-437.
- Adams MD, JM Kelley JM, Gocayne JD, Dubnick M, Polymeropoulos MH, Xiao H, Merrill CR, Wu A, Olde B, Moreno RF, Kerlavage AR, McCombie WR, Venter C.** (1991). Complementary DNA sequencing: expressed sequence tags and human genome project. *Science*, 252:1651-1656.
- Adams MJ, Antoniw JF, Bar-Joseph M, Brunt AA, Candresse T, Foster GD, Martelli GP, Milne RG, Zavriev SK, Fauquet M.** (2004). The new plant virus family Flexiviridae and assesment of molecular criteria for species demarcation. *Arch Virol*, 149:1045-1060.
- Akopyanz N, Bukanov, T, Westblom U, Berg DE.** (1992). PCR-based RFLP analysis of DNA sequence diversity in the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nucleic Acids Res*, 20(23):6221-6225.
- Albrecht M, Takken FLW.** (2006). Update on the domain architectures of NLRs and R proteins. *Biochem Biophys Res Commmun*, 339:459-462.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ.** (1990). Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*, 215(3):403-410.
- Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ.** (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res*, 25(17):3389-3402.
- Andersen JR, Lübberstedt T.** (2004). Functional markers in plants. *Trends Plant Sci*, 8:554-560.
- Bailey NTJ.** (1961). Introduction to the mathematical theory of linkage. Clarendon Press, Oxford, Reino Unido.
- Bakker E, Butterbach P, Rouppe van der Voort J, van der Vossen E, van Vliet J, Bakker J, Goverse A.** (2003). Genetic and physical mapping of homologues of the virus resistance gene *Rx1* and the cyst nematode resistance gene *Gpa2* in potato. *Theor Appl Genet*, 106:1524–1531.
- Bamberg JB, Palta JP, Vega SE.** (2005). *Solanum commersonii* cytoplasm does not improve freezing tolerance in substitution backcross hybrids with frost-sensitive potato species. *Amer J Potato Res*, 82:251-254.
- Barone A., Sebastiano A, Carputo D, della Rocca F, Frusciante L.** (2001). Molecular marker-assisted introgression of the wild *Solanum commersonii* genome into cultivated *S. tuberosum* gene pool. *Theor Appl Genet*, 102:900-907.
- Barone A, Li J, Sebastiano A, Cardi T, Frusciante L.** (2002). Evidence for tetrasomic inheritance in a tetraploid *Solanum commersonii* (+) *S. tuberosum* somatic hybrid through the use of molecular markers. *Theor Appl Genet*, 104:539-546.
- Bassam BJ, Caetano-Anollés G, Gresshoff PM.** (1992). DNA amplification fingerprinting of bacteria. *Appl Microbiol Biotechnol*, 38(1):70-76.
- Batten JS, Yoshinari S, Hemenway C.** (2003). Potato virus X: a model system for virus replication, movement and gene expression. *Mol Plant Pathol*, 4(2):125-131.

- Baumgarten A, Cannon S, Spangler R, May G.** (2003). Genome-level evolution of resistance genes in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics*, 165:309-319.
- Becker, J., Heun, M.** (1995). Barley microsatellites: allelic variation and mapping. *Plant Mol Biol*, 27:835-845.
- Becker J, Vos P, Kuiper M, Salamini F, Heun M.** (1995). Combined mapping of AFLP and RFLP markers in barley. *Mol Gen Genet*, 249(1):65-73.
- Beckman J, Soller M.** (1990). Toward a unified approach to genetic mapping of eukaryotes based on sequence tagged microsatellites sites. *Biotechnology*, 8: 930-932.
- Bendahmane A, Kohn BA, Dedi C, Baulcombe DC.** (1995). The coat protein of potato virus X is a strain-specific elicitor of *Rx1*-mediated virus resistance in potato. *Plant J*, 8:933-941.
- Bendahmane A, Kanyuka K, Baulcombe DC.** (1999). The *Rx* gene from potato controls separate virus resistance and cell death responses. *Plant Cell*, 11:781-792.
- Bendahmane A, Querci M, Kanyuka K, Baulcombe DC.** (2000). *Agrobacterium* transient expression system as a tool for the isolation of disease resistance genes: application to the *Rx2* locus in potato. *Plant J*, 21: 73-81.
- Bendahmane A, Farnham G, Moffet P, Baulcombe DC.** (2002). Constitutive gain-of-function mutants in a nucleotide binding site-leucine rich repeat protein encoded at the *Rx* locus of potato. *Plant J*, 32:195-204.
- Bent AF.** (1996). Plant disease resistance genes: function meets structure. *Plant Cell*, 8:1757-1771.
- Bent AF, Mackey D.** (2007). Elicitors, effectors, and *R* genes: the new paradigm and a lifetime supply of questions. *Annu Rev Phytopathol*, 45:399-436.
- Bernacchi D, Tanksley SD.** (1997). An interespecific backcross of *Lycopersicon esculentum* x *L. hirsutum*: linkage analysis and QTL study of sexual compatibility factors and floral traits. *Genetics*, 147:861-877.
- Birren B, Mancino V, Shizuya H.** (1999) *Bacterial Artificial Chromosomes*, en *Genome Analysis: A laboratory Manual*. Birren B., Green E.D., Klapholz S., Myers R.M., Riethman H., Roskams J (eds). Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, EUA. Vol. 3 (*Cloning Systems*), Cap.4, 241-295.
- Bleas MJ, de Grandis SA, Lee H, Trevors JT.** (1998) Amplified fragment length polymorphism (AFLP): a review of the procedure and its applications. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 21:99-114.
- Bonas U, Lahaye T.** (2002). Plant disease resistance triggered by pathogen-derived molecules: refined models of specific recognition. *Curr Opin Microbiol*, 5:44-50.
- Bonierbale MW, Plaisted RL, Tanksley SD.** (1988). RFLP Maps Based on a Common Set of Clones Reveal Modes of Chromosomal Evolution in Potato and Tomato. *Genetics*, 120:1095-1103.
- Bonierbale MW, Plaisted RL, Pineda O, Tanksley SD.** (1994). QTL analysis of trichome mediated insect resistance in potato. *Theor Appl Genet*, 87:973-987.
- Bonin A, Ehrich D, Manel S.** (2007). Statistical analysis of amplified fragment length polymorphism data: a toolbox for molecular ecologists and evolutionists. *Mol Ecology*, 16:3737-3758.
- Bormann CA, Rickert AM, Castillo Ruiz RA, Paal J; Lübeck J, Strahwald J, Buhr K, Gebhardt C.** (2004). Tagging quantitative trait loci for maturity-corrected late blight resistance in tetraploid potato with PCR-based candidate gene markers. *Mol Plant-Microbe Interact*, 17:1126-1138.
- Botella MA, Coleman MJ, Hughes DE, Nishimura MT, Jones JDG, Somerville SC** (1997) Map positions of 47 *Arabidopsis* sequences with sequence similarity to disease resistance genes. *Plant J*, 12:1197-1211.

- Botstein B, White RL, Skolnick M, Davis RW.** (1980). Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am J Hum Genet*, 32:314-331.
- Bradshaw JE.** (1994). Quantitative genetics theory for tetrasomic inheritance. *Potato Genetics*, 71-100. Bradshaw JE, Mackay GR (eds). CAB International, Wallingford. Reino Unido.
- Bradshaw JE, Mackay GR.** (1994). Breeding strategies for clonally propagated potatoes. *Potato Genetics*, 467-497. Bradshaw JE, Mackay GR (eds). CAB International, Wallingford; Reino Unido.
- Bradshaw JE, Pande B, Bryan GJ, Hackett CA, McLean K, Solomon-Blackburn RM.** (2004). Interval mapping of quantitative trait loci for resistance to late blight [*Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary], height and maturity in a tetraploid population of potato (*Solanum tuberosum* subsp. *tuberosum*). *Genetics*, 168:983-995.
- Bradshaw JE, Bryan GJ, Lees AK, McLean K, Solomon-Blackburn RM.** (2006). Mapping the R10 and R11 genes for resistance to late blight (*Phytophthora infestans*) present in the potato (*Solanum tuberosum*) R-gene differentials of black. *Theor Appl Genet*, 112(4):744-751.
- Brandwagt BF, Mesbah LA, Takken FLW, Laurent PL, Kneppers TJA, Hille J, Nijkamp HJJ.** (2000). A longevity assurance gene homolog of tomato mediates resistance to *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici* toxins and fumonisin B1. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97:4961-4966.
- Brommonschenkel SH, Tanksley SD.** (1997). Map-based cloning of the tomato genomic region that spans the *Sw-5* tospovirus resistance gene in tomato. *Mol Gen Genet*, 256-121-126.
- Brommonschenkel SH, Frary A, Frary A, Tanksley SD.** (2000). The broad-spectrum tospovirus resistance gene *Sw-5* of tomato is a homolog of the root-knot nematode resistance gene *Mi*. *Mol Plant Microbe Interact*, 13(10):1130-1138.
- Brown CR.** (1990). Modern Evolution of the Cultivated Potato Gene Pool. Vayda ME, Park WD (eds). *The Molecular and Cell Biology of the Potato*. Redwood Press Ltd. 1-12.
- Brown CR, Salazar L, Ochoa C, Chuquillanqui C.** (1984). *9th triennial Conference of the European Association for Potato Research*, 249.
- Brugmans B, van derHulst RG, Visser RGF, Lindhout P, van Eck HJ.** (2003). A new and versatile method for the successful conversion of AFLP markers into simple single locus markers. *Nucleic Acids Res*, 31(10):e55.
- Brugmans B, Hutten RGB, Rookmaker ANO, Visser RGF, van Eck HJ.** (2006). Exploitation of a marker dense linkage map of potato for positional cloning of a wart disease resistance gene. *Theor Appl Genet*, 112:269-277
- Brugmans B, Wouters D, van Os H, Hutten R, van der Linden G, Visser RGF, van Eck HJ, van der Vossen EAG.** (2008). Genetic mapping and transcription analyses of resistance gene loci in potato using NBS profiling. *Theor Appl Genet*, 117:1379-1388.
- Bryan GJ, McLean K, Bradshaw JE, De Jong WS, Phillips M, Castelli L, Waugh R.** (2002). Mapping QTLs for resistance to the cyst nematode *Globodera pallida* derived from the wild potato species *Solanum vernei*. *Theor Appl Genet*, 105:68-77.
- Burr B, Evoca SV, Burr FA, Beckman JS.** (1983). *Genetic Engineering: Principles and Methods*. Vol 5, 45. Plenum, Nueva York, EUA.
- Bussell JD, Waycott M, Chappill JA.** (2005). Arbitrarily amplified DNA markers as characters for phylogenetic inference. *Perspect Plant Ecol Evol Sys*, 7:3-26.
- Cadman CH.** (1942). Autotetraploid inheritance in the potato: some new evidence. *J Genet*, 44:33-52.

- Caetano-Anollés G.** (1993). Amplifying DNA with arbitrary oligonucleotide primers. *PCR Methods Applic*, 3: 85-94.
- Caetano-Anollés G.** (1994). MAAP: a versatile and universal tool for genome analysis. *Plant Mol Biol*, 25:1011-1026.
- Caetano-Anollés G, Bassam BJ, Gresshoff PM.** (1991). DNA amplification fingerprinting using very short arbitrary oligonucleotide primers. *BioTechnology*, 9(6):553-557.
- Calder VL, Palukaitis P.** (1992). Nucleotide sequence analysis of the movement genes of resistance breaking strains of tomato mosaic virus. *J Gen Virol*, 73:165-168.
- Calenge F, van der Linden CG, van de Weg E, Schouten HJ, van Arkel G, Denance C, Durel CE.** (2005). Resistance gene analogues identified through the NBS-profiling method map close to major genes and QTL for disease resistance in apple. *Theor Appl Genet*, 110:660-668.
- Camadro E.** (1996). Especies silvestres y mejoramiento genético de la papa. *Ciencia Hoy*, 6(35):46-53.
- Cardi T, Bastia T, Monti L, Earle ED.** (1999). Organelle DNA and male sterility variation in *Solanum* spp and interspecific somatic hybrids. *Theor Appl Genet*, 99:819-828.
- Caromel B, Mugnier D, Kerlan M-C, Andrzejewski S, Ellisseche D.** (2005) Resistance quantitative trait loci originating from *Solanum sparsipilum* act independently on the sex ratio of *Globodera pallida* and together for developing a necrotic reaction. *Mol Plant Microbe Interact*, 18(11):1186-1194.
- Carputo D, Cardi T, Speggorin M, Zoina A, Frusciante L.** (1997a). Resistance to blackleg and tuber soft rot in sexual and somatic interspecific hybrids with different genetic background. *Am Potato J*, 74:161-172.
- Carputo D, Barone A, Cardi T, Sebastiano A, Frusciante L, Peloquin SJ.** (1997b) Endosperm balance number manipulation for direct in vivo germplasm introgression to potato from a sexually isolated relative (*Solanum commersonii* Dun.). *Proc Natl Acad Sci USA*, 94:12013-12017.
- Carputo D, Barone A, Frusciante L.**(2000). 2n gametes in the potato:essential ingredients for breeding and germplasm transfer. *Theor Appl Genet*, 101:805-813.
- Carputo D, Frusciante L, Monti L, Parisi M, Barone A.** (2002). Tuber quality and soft rot resistance of hybrids between *Solanum tuberosum* and the incongruent wild relative *S. commersonii*. *Am J Potato Res*, 79:345-352.
- Carputo D, Terra A, Barone A, Esposito F, Fogliano V, Monti L, Frusciante L.** (2003). Glycoalkaloids and acclimation capacity of hybrids between *Solanum tuberosum* and the incongruent hardy species *Solanum commersonii*. *Theor Appl Genet*, 107:1187-1194.
- Celebi-Toprak F, Slack SA, Jahn MM.** (2002). A new gene, *Nytbr*, for hypersensitivity to Potato virus Y from *Solanum tuberosum* maps to chromosome IV. *Theor Appl Genet*, 104:669-674.
- Chagué V, Mercier JC, Guénard M, de Courcel A, Vedel F.** (1996). Identification and mapping on chromosome 9 of RAPD markers linked to *Sw-5* in tomato by bulked segregant analysis. *Theor Appl Genet*, 92:1045-1051.
- Chapman S, Kavanagh T, Baulcombe D.** (1992). Potato virus X as a vector for gene expression in plants. *Plant J*, 2:549-557.
- Chen XM, Line RF, Leung H.** (1998). Genome scanning for resistance-gene analogs in rice, barley, and wheat by high resolution electrophoresis. *Theor Appl Genet*, 97:345-355.

- Chen Y-KH, Palta JP, Bamberg JB.** (1999). Freezing tolerance and tuber production in selfed and backcross progenies derived from somatic hybrids between *Solanum tuberosum* L. and *S. commersonii* Dun. *Theor Appl Genet*, 99:100-107.
- Chen X, Salamini F, Gebhardt C.** (2001). A potato molecular function map for carbohydrate metabolism and transport. *Theor Appl Genet*, 102:284-295.
- Chetelat RT, deVerna JW.** (1991). Expression of unilateral incompatibility in pollen of *Lycopersicon pennellii* is determined by major loci on chromosomes 1, 6 and 10. *Theor Appl Genet*, 82:704-712.
- Chisholm ST, Coaker G, Day B, Staskawicz BJ.** (2006). Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. *Cell*, 124:803-814.
- Cho YG, Blair MW, Panaud O, McCouch SR.** (1996). Cloning and mapping of variety-specific rice genomic DNA sequences: amplified fragment length polymorphisms (AFLP) from silver-stained polyacrylamide gels. *Genome*, 39:373-378.
- Choi SH, Ryu KH.** (2008). Determination of complete genome sequence of Korean isolate of Potato virus X. *Plant Pathol J*, 24: 361-364.
- Chunwongse J, Doganlar S, Crossman C, Jiang J, Tanksley SD.** (1997). High resolution map of the *Lv* resistance locus in tomato. *Theor Appl Genet*, 95:220-223.
- Cockerham, G.** (1955). Strains of potato virus X. Streutgers E, Beemster ABR, van der Want JPH. (eds). *Proceedings of the 2nd Conference on Potato Virus Diseases, Lisse-Wageningen, 1954*, pp. 89-92. H. Veenman & Zonen, Wageningen, Países Bajos.
- Cockerham, G.** (1970). Genetical studies on resistance to potato viruses X and Y. *Heredity*, 25:309-348.
- Collins NC, Webb CA, Seah S, Ellis JG, Hulbert SH, Pryor A.** (1998). The isolation and mapping of disease resistance gene analogs in maize. *Mol Plant Microbe Interact*, 11:968-978.
- Collins N, Park R, Spielmeyer W, Ellis J, Pryor AJ.** (2001) Resistance gene analogs in barley and their relationship to rust resistance genes. *Genome*, 44:375-381.
- Dangl JL, Jones JD.** (2001). Plant pathogens and integrated defense responses to infection. *Nature*, 411:826-833.
- Davidson TMV.** (1980). Breeding for resistance to virus disease of the potato (*Solanum tuberosum*) at the Scottish Plant Breeding Station. *Scottish Plant Breeding Station 59th Annual Report*, 100-108. Scottish Plant Breeding Station, Edinburgh; Reino Unido.
- De Bokx JA.** (1972). Test plants. De Bokx JA (eds). *Viruses of Potatoes and Seed-Potato Production*, 102-110. PUDOC, Wageningen, Países Bajos.
- De Jong W, Forsyth A, Leister D, Gebhardt C, Baulcombe DC.** (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.
- de los Reyes BG.** (2008). Functional genomic analysis of cold acclimation in the genus *Solanum*. http://www.tigr.org/tigr-scripts/tdb/sol_study.pl
- de Vries J, de Jongorius R, Sandbrink H, Lindhout, P.** (1992). RAPD markers assist in resistance breeding. *Prophyta*, 2:50-51.
- Debener T, Salamini F, Gebhardt C.** (1990). Phylogeny of wild and cultivated *Solanum* species based on nuclear restriction fragment length polymorphisms (RFLPs). *Theor Appl Genet*, 79:360-368.
- Devey ME, Delfino-Mix A, Kinloch BB, Neale DB.** (1995). Random amplified polymorphic DNA markers tightly linked to a gene for resistance to white pine blister rust in sugar pine. *Proc Natl Acad Sci USA*, 92: 2066-2076.
- Díaz-Pendón JA, Truniger V, Nieto C, Gracia-Mas J, Bendhamane A, Aranda MA.** (2004). Advances in understanding recessive resistance to plant virus. *Mol Plant Pathol*, 5:223-233.

- Dilbirligi M, Gill KS.** (2003) Identification and analysis of expressed resistance gene sequences in wheat. *Plant Mol Biol*, 53:771–787.
- Dixon RA, Harrison MJ, Lamb CJ.** (1994). Early events in the activation of plant defense responses. *Ann Rev Phytopathol*, 32:479-501.
- Dong F, Song J, Naess SK, Helgeson JP, Cebhardt C, Jiang J.** (2000). Development and applications of a set of chromosome-specific cytogenetic DNA markers in potato. *Theor Appl Genet*, 101:1001-1007.
- Egea-Gilabert C, Dickinson MJ, Bilotti G., Candela ME.** (2003). Isolation of resistance gene analogs in pepper using modified AFLPs. *Biol Plant*, 47:27–32.
- Ellis J, Meter D.** (2000). Structure, function and evolution of plant disease resistance genes. *Curr Opin Plant Biol*, 3:278-284.
- Eshed Y, Zamir D.** (1994). A genomic library of *Lycopersicon pennellii* in *L. esculentum*: a tool for fine mapping of genes. *Euphytica*, 79:175-179.
- Eshed Y, Zamir D.** (1995). An introgression line population of *Lycopersicon pennellii* in the cultivated tomato enables the identification and fine mapping of yield associated QTL. *Genetics*, 141:1147-1162.
- Evola SV, Burr FA, Burr B.** (1986). The suitability of restriction fragment length polymorphisms as genetic markers in maize. *Theor Appl Genet*, 71: 765-771.
- FAO.** (2008). *Food and Agriculture Organization of the United Nations*. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. <http://www.fao.org>
- FAOSTAT.** (2008). *Food and Agriculture Organization of the United Nations Statistical Database*. Base de Datos Estadística de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. <http://faostat.fao.org/default.aspx>
- Farnham G, Baulcombe DC.** (2006) Artificial evolution extends the spectrum of viruses that are targeted by a disease-resistance gene from potato. *Proc Natl Acad Sci USA*, 103:18828-18833.
- Feinberg AP, Vogelstein B.** (1983). A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem*, 132:6-13.
- Feinberg AP, Vogelstein B.** (1984) A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. Addendum. *Anal Biochem*, 137:266-267.
- Feingold S, Lloyd EJ, Norero EN, Bonierbale EM, Lorenzen J.** (2005). Mapping and characterization of new EST-derived microsatellites for potato (*Solanum tuberosum* L.). *Theor Appl Genet*, 111:456-466.
- Fernández-Northcote EN.** (1990). Variability of PVX and PVY and its relationships to genetic resistance. *Control of virus and virus-like diseases of potato and sweet potato*. Report of the III Planing Conference, Lima, Peru, 20-22 Nov. 1989 21-28. CIP, Internacional Potato Center, Lima, Perú.
- Fernández-Northcote EN, Lizárraga C.** (1991). Distribución geográfica de serotipos de virus X de la papa. *Fitopatología*, 26:13-18.
- Flor HH.** (1947). Host-parasite interaction in flax-rust –its genetics and other implications. *Phytopathology*, 45:680-685.
- Flor HH.** (1971). Current status of the gene-for-gene concept. *Annu Rev Phytopathol*, 9:275-298.
- Folkertsma R, Spassova M, Prins M, Stevens M, Hille J, Godbach R.** (1999). Construction of a bacterial artificial chromosome (BAC) library of *Lycopersicon esculentum* cv. Stevens and its application to physically map the *Sw-5* locus. *Mol Breed*, 5:197-207.
- Fooland MR.** (1996). Unilateral incompatibility as a major cause of skewed segregation in the cross between *Lycopersicon esculentum* and *L. pennellii*. *Plant Cell Rep*, 15:627-633.

- Gamborg OL, Shyluk JP, Shahin EA.** (1981). Isolation, fusion and culture of plant protoplasts. Thorpe TA (eds). *Plant tissue culture and its application in agriculture*, 115-153. Academic Press Inc., Nueva York, EUA.
- Garland S, Sharman S, Persley D, McGrath D.** (2005). The development of an improved PCR-based marker system for *Sw-5* an important TSWV resistance gene of tomato. *Au J Agr Res*, 56:285-289.
- Gebhardt C, Ritter E, Debener T, Schachtschabel U, Walkemeier B, Uhrig H, Salamini F.** (1989). RFLP analysis and linkage mapping in *Solanum tuberosum*. *Theor Appl Genet*, 78:65-75.
- Gebhardt C, Ritter E, Barone A, Debener T, Walkemeier B, Schachtschabel U, Kaufmann H, Thomson RD, Bonierbale MW, Ganal MW, Tanksley SD, Salamini, F.** (1991). RFLP maps of potato and their alignment with the homoeologous tomato genome. *Theor Appl Genet*, 83: 49-57.
- Gebhardt C, Salamini F.** (1992). Restriction fragment length polymorphism analysis of plant genomes and its application to plant breeding. *Int Rev Cytol*, 135:201-237.
- Gebhardt C, Mugniéry D, Ritter E, Salamini F, Bonnel E.** (1993). Identification of RFLP markers closely linked to the *Hl* 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, Ballvora A, Walkenmeier B, Oberhagemann P, Schuller 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. *Mol Breed*, 13:93-102.
- Gebhardt C, Bellin D, Henselewski H, Lehmann W, Schwarzfischer J, Valkonen JPT.** (2006). Marker-assisted combination of major genes for pathogen resistance in potato. *Theor Appl Genet*, 112: 1458-1464.
- Ghareyazie B, Huang N, Second G, Bennet J, Kush GS.** (1995). Classification of rice germplasm. I. Analysis using ALP and PCR-based RFLP. *Theor Appl Genet*, 91: 218-227.
- Ghislain M, Spooner DM, Rodríguez F, Villamón F, Núñez J, Vásquez C, Waugh R, Bonierbale M.** (2004). Selection of a highly informative and user friendly microsatellites (SSR) for genotyping of cultivated potato. *Theor Appl Genet*, 108:881-890.
- Gilbert J, Spillane C, Kavanagh TA, Baulcombe DC.** (1998). Elicitation of *Rx*-mediated resistance to PVX in potato does not require new RNA synthesis and may involve a latent hypersensitive response. *Mol Plant Microbe Interact*, 8:833-835.
- Giovannoni JJ, Wing RA, Ganal MW, Tanksley SD.** (1991). Isolation of molecular markers from specific chromosomal intervals using DNA pools from existing mapping populations. *Nucleic Acids Res*, 19:6553-6558.
- Goff SA, Ricke D, Lan TH, Presting G, Wang R, Dunn M, Glazebrook J, Sessions A, Oeller P, Varma H, Hadley D, Hutchison D, Martin C, Katagiri F, Lange BM, Moughamer T, Xia Y, Budworth P, Zhong J, Miguel T, Paszkowski U, Zhang S, Colbert M, Sun WL, Chen L, Cooper B, Park S, Wood TC, Mao L, Quail P, Wing R, Dean R, Yu Y, Zharkikh A, Shen R, Sahasrabudhe S, Thomas A, Cannings R, Gutin A, Pruss D, Reid J, Tavtigian S, Mitchell J, Eldredge G, Scholl T, Miller RM, Bhatnagar S, Adey N, Rubano T, Tusneem N, Robinson R, Feldhaus J, Macalma T, Oliphant A, Briggs S.** (2002). A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. *Japonica*). *Science*, 296:92-100.
- Goldman D, Merrill CR.** (1982). Silver staining of DNA in polyacrylamide gels: linearity and effect of fragment size. *Electrophoresis*, 3:24-27.

- Görg R, Schachtschabel U, Ritter E, Salamini F, Gebhardt C.** (1992). Discrimination among 136 tetraploid potato varieties by fingerprints using highly polymorphic DNA markers. *Crop Sci*, 32:815–819.
- Graham MA, Marek LF, Lohnes D, Cregan P, Shoemaker RC.** (2000). Expression and genome organization of resistance gene analogs in soybean. *Genome*, 43:86–93.
- Grant M, Godiard L, Straube E, Ashfield T, Lewald J, Sattler A, Innes R, Dangl J.** (1995). Structure of the Arabidopsis RPM1 gene enabling dual specificity disease resistance. *Science*, 269:843-846.
- Grimmer MK, Trybush S, Hanley S, Francis SA, Karp A, Asher MJC.** (2007). An anchored linkage map for sugar beet based on AFLP, SNP and RAPD markers and QTL mapping of a new source of resistance to *Beet necrotic yellow vein virus*. *Theor Appl Genet*, 114:1151–1160
- Grube RC, Radwanski ER, Jahn M.** (2000). Comparative genetics of disease resistance within the *Solanaceae*. *Genetics*, 155:873-887.
- Gupta PK, Rustgi S.** (2004). Molecular markers from the transcribed/expressed region of the genome in higher plants. *Funct Integr Genomics*, 4:139-162.
- Gur A, Zamir D.** (2004). Unused natural variation can lift yield barriers in plant breeding. *PLoS Biol*, 2:e245.
- Haley SD, Miklas PN, Stavely JR, Byrum J, Kelly JD.** (1993). Identification of RAPD markers linked to a major rust resistance gene block in common bean. *Theor Appl Genet*, 86:505-508.
- Hämäläinen JH, Watanabe KN, Valkonen JPT, Arihara A, Plaisted RL, Pehu E.** (1997). Mapping and marker-assisted selection for a gene for extreme resistance to potato virus Y. *Theor Appl Genet*, 94:192-197.
- Hammond J.** (1990). *Report of the 3 Planing Conference, Lima, Peru, 20-22 Nov. 1989* 173-177. Internacional Potato Center, Lima, Perú.
- Hammond-Kosack KE, Jones JD.** (1997). Plant disease resistance genes. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 48:575-607.
- Harrison BD.** (2002). Virus variation in relation to resistance-breaking in plants. *Euphytica* 124:181-192.
- Hawkes JG.** (1977). The importance of wild germplasm in plant breeding. *Euphytica*, 26:615-621.
- Hayes AJ, Saghai-Marooif MA.** (2000). Targeted resistance gene mapping in soybean using modified AFLPs. *Theor Appl Genet*, 100:1279-1283.
- Heath MC.** (2000). Hypersensitive response-related cell death. *Plant Mol Biol*, 44:321-334.
- Helentjaris T, King G, Slocum M, Siedestrang C, Wegman S.** (1985). Restriction fragment polymorphisms as probes for plant diversity and their development as tools for applied plant breeding *Plant Mol Biol*, 5:109-118.
- Herrera-Arellano A, Jiménez-Ferrer E, Vega-Pimentel AM, Martínez-Rivera MdeL, Hernández-Hernández M, Zamilpa A, Tortoriello J.** (2004). Clinical and mycological evaluation of therapeutic effectiveness of *Solanum chrysotrichum* standardized extract on patients with Pityriasis capitis (dandruff). A double blind and randomized clinical trial controlled with ketoconazole. *Planta Medica*, 70(6): 483-488.
- Hijmans RJ, Spooner DM.** (2001). Geographic distribution of wild potato species. *Am J Botany*, 88(11): 2101-2112.
- Hijmans RJ, Spooner DM, Salas AR, Guarino L, de la Cruz J.** (2002). Systematics and ecogeographic studies on crop genepools 10. *Atlas of wild potatoes*. IPGRI, International Plant Genetics Resource Institute. Italia.
<http://www.bioversityinternational.org/publications/publications/>

- Hooker WJ.** (1981). *Compendium of Potato Diseases* 98. American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, 106pp.
- Hooker WJ.** (1986). Enfermedades virosas de la papa. Montevideo, Hemisferio Sur y Centro Internacional de la Papa. *Boletín de Información Técnica* 19.
- Hopp HE, Hain L, Bravo Almonacid F, Arese IA, Tozzini AC, Ceriani MF, Saladrigas M, Orman B, Celnik R, Mentaberry A.** (1991). Development and application of a nonradioactive nucleic acid hybridization system for simultaneous detection of four potato pathogens. *J Virol Meth*, 31:11-29.
- Hopp HE y Martínez MC.** (2005). Marcadores Moleculares. *Agrobiotecnología*. Mentaberry A (eds). Libro Virtual. UNU-BIOLAC, United Nations University, Biotechnology for Latin America and the Caribbean. <http://unu-biolac.com>
- Howard HW.** (1970). *Genetics of the potato*. Logos Press, Londres, Reino Unido.
- Huang X, Madan A.** (1999). CAP3: A DNA sequence assembly program. *Genome Res*, 9:868-877.
- Huang YL, HanYT, Chang YT, HSU YH, Meng M.** (2004). Critical residues for GTP methylation and formation of covalent m⁷GMP-enzyme intermediate in the capping enzyme domain of bamboo mosaic virus. *J Virol*, 78:1271-1280.
- Hudakova S, Michalek W, Presting GG, ten Hoopen R, dos Santos K, Jasencakova Z, Schubert I.** (2001). Sequence organization of barley centromeres. *Nucleic Acids Res*, 29:5029-5035.
- Huisman MJ, Linthorst HJ, Bol JF, Cornelissen JC.** (1988). The complete nucleotide sequence of potato virus X and its homologies at the aminoacid level with various plus-stranded RNA viruses. *J Gen Virol*, 69:1789-1798.
- Hulbert SH, Webb CA, Smith SM, Sun Q.** (2001). Resistance gene complexes: evolution and utilization. *Annu Rev Phytopathol*, 39:285-312.
- Hunger S, Gaspero GD, Mohring S, Bellin D, Schafer-Pregl R, Borchardt DC, Durel CE, Werber M, Weisshaar B, Salamini F, Schneider K.** (2003). Isolation and linkage analysis of expressed disease-resistance gene analogues of sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Genome*, 46:70-82.
- Iovene M, Barone A, Frusciante L, Monti L, Carputo D.** (2004). Selection for aneuploid potato hybrids combining a low wild genome content and resistance traits from *Solanum commersonii*. *Theor Appl Genet*, 109: 1139-1146.
- Jacobs JME, Van Eck HJ, Arens P, Verkerk-Bakker B, te Lintel Hekkert B, Bastiaanssen HJM, El-Kharbotly A, Pereira A, Jacobsen E, Stiekema WJ.** (1995). A genetic map of potato (*Solanum tuberosum*) integrating molecular markers, including transposons, and classical markers. *Theor Appl Genet*, 91:289-300.
- Jacobs J, van Eck H, Horsman C, Arens PFP, Verkerk-Bakker B, Jacobsen E, Pereira A, Stiekema W.** (1996). Mapping of resistance to the potato cyst nematode *Globodera rostochiensis* from the wild potato species *Solanum vernei*. *Mol Breed*, 2:51-60.
- Jahn MK, Paran I, Hoffman K, Radwanski ER, Livingstone KD, Grube RC, Aftergoot E, Lapidot M, Moyer J.** (2000). Genetic mapping of the *Tsw* locus for resistance to the Tospovirus Tomato Spotted Wilt Virus in *Capsicum* spp. and its relationship to the *Sw-5* gene for resistance to the same pathogen in tomato. *Mol Plant Microbe Interact*, 13(6):673-682.
- Jansky S.** (2006). Overcoming hybridization barriers in potato. *Plant Breed*, 125:1-12.
- Jones CJ, Edwards KJ, Castaglione S, Winfield MO, Sala F, van de Wiel C, Bredemeijer G, Vosman B, Matthes M, Daly A, Brettschneider R, Bettini P, Buiatti M, Maestri E, Malcevski A, Marmioli N, Aert R, Volckaert G, Rueda J, Linacero**

- R, Vazquez A, Karp A.** (1997). Reproducibility testing of RAPD, AFLP and SSR markers in plants by a network of European laboratories *Mol Breed*, 3:381-390.
- Jones RAC.** (1981). The ecology of viruses infecting wild and cultivated potatoes in the Andean region of South America. *Pest, pathogen and vegetation: the role of weeds and wild plants in the ecology of crop pest and diseases*. Thresh JM (eds). 89-107. Londres, Reino Unido
- Jones RAC.** (1985). Further studies on resistance-breaking strains of potato virus X. *Plant Pathology*, 34: 182-186.
- Jones DA, Jones JD.** (1996). The roles of leucine rich repeats in plant defenses. *Adv Bot Res Adv Plant Pathol*, 24:90-167.
- Jones JDG, Dangl JL.** (2006). The plant immune system. *Nature*, 444:323-329.
- Kagiwada S, Yamaji Y, Nakabayashi H, Masashi Ugaki M, Namba S.** (2002). The complete nucleotide sequence of Potato virus X Strain OS: the first complete sequence of a Japanese isolate. *J Gen Plant Pathol*, 68 : 94-98.
- Kajava AV.** (1998). Structural diversity of leucine-rich repeats proteins. *J Mol Biol*, 277:519-527.
- Kanazin V, Marek LF, Shoemaker RC.** (1996). Resistance gene analogs are conserved and clustered in soybean. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93:11746-11750.
- Kasai K, Morikawa Y, Sorri VA, Valkonen JPT, Gebhardt C, Watanabe KN.** (2000). Development of SCAR markers to the PVY resistance gene *Ry^{adg}* based on a common feature of plant disease resistance genes. *Genome*, 43:1-8.
- Kavanagh T, Goulden M, Santa Cruz S, Chapman S, Barker I, Baulcombe D.** (1992). Molecular analysis of a resistance-breaking strain of potato virus X *Virology*, 189:609-617.
- Kawchuk LM, Lynch DR, Thomas J, Penner B, Sillito D, Kulcsar F.** (1996). Characterization of *Solanum tuberosum* simple sequence repeats and application to potato cultivar identification. *Am Potato J*, 73:325-335.
- Keen NT.** (1990). Gene-for-gene complementarity in plant-pathogen interactions. *Annu Rev Genet*, 24:447-463.
- Kim GH, Yun HK, Choi CS, Park JH, Jung YJ, Park KS, Dane F, Kang KK.** (2007). Identification of AFLP and RAPD markers linked to anthracnose resistance in grapes and their conversion to SCAR markers. *Plant Breeding*, 127(4):418-423.
- Konieczny A, Ausubel FM.** (1993). A procedure for mapping Arabidopsis mutations using co-dominant ecotype-specific PCR-based markers. *Plant J*, 4:403-410.
- Kosambi DD.** (1944). The estimation of map distance from recombination values. *Annals of Eugenics*, 12(3):172-175.
- Kruglyak S, Durrett RT, Schug MD, Aquadro CF.** (1998). Equilibrium distributions of microsatellite repeat length resulting from a balance between slippage events and point mutations. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95:10774-10778.
- Kuhl JC, Hanneman Jr RE, Havey MJ.** (2001). Characterization and mapping of *Rpi1*, a late-blight resistance locus from diploid (1EBN) Mexican *Solanum pinnatisectum*. *Mol Genet Genomics*, 265:977-985.
- Kuhn DN, Heath M, Wissner RJ, Meerow A, Brown JS, Lopes U, Schnell RJ.** (2003). Resistance gene homologues in *Theobroma cacao* as useful genetic markers. *Theor Appl Genet*, 107:191-202.
- Laferriere LT, Helgeson JP, Allen C.** (1999). Fertile *Solanum tuberosum*+*S. commersonii* somatic hybrids as sources of resistance to bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum*. *Theor Appl Genet*, 98:1272-1278.
- Lagudah ES, Dubcovsky J, Powell W.** (2001). Wheat genomics. *Plant Physiol Biochem*, 39:335-344.

- Lander ES, Green P, Abrahamson J, Barlow A, Daly MJ, Lincoln SE, Newburg L.** (1987). MAPMAKER: an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. *Genomics*, 1:174-181.
- Lanfermeijer FC, Dijkhuis J, Sturre MJG, de Haan P, Hille J.** (2003). Cloning and characterization of the durable tomato mosaic virus resistance gene *Tm-2(2)* from *Lycopersicon esculentum*. *Plant Mol Biol*, 52:1037-1049.
- Lanfermeijer FC, Warmink J, Hille J.** (2005). The products of the broken *Tm-2* and the durable *Tm-2(2)* resistance genes from tomato differ in four amino acids. *J Exp Bot*, 56:2925-2933
- Lapitan NLV, Brown SE, Kennard W, Stephen JL, Knudson DL.** (1997). FISH physical mapping with barley BAC clones. *Plant J*, 11:149-156.
- Lee MR.** (2006). The *Solanaceae*: foods and poisons. *J R Coll Physicians Edinb* 36:162-169.
- Lefebvre V, Pflieger S, Thabuis A, Caranta C, Blattes A, Chauvet JC, Daubeze AM, Palloix A.** (2002). Towards the saturation of the pepper linkage map by alignment of three intraspecific maps including known-function genes. *Genome*, 45:839-854.
- Leister D.** (2004). Tandem and segmental gene duplication and recombination in the evolution of plant disease resistance genes. *Trends Genet*, 20:116-122.
- Leister D, Ballvora A, Salamini F, Gebhardt C.** (1996) A PCR-based approach for isolating pathogen resistance genes from potato with potential for wide application in plants. *Nature Genet*, 14:421-429.
- Leonards-Schippers, C., Gieffers, W., Salamini, F. y Gebhardt, C.** (1992). The *RI* gene conferring race-specific resistance to *Phytophthora infestans* in potato is located on potato chromosome V. *Mol Gen Genet*, 233:278-283.
- Li Z, Pan J, Guan Y, Tao Q, He H, Si L, Cai R.** (2008). Development and fine mapping of three co-dominant SCAR markers linked to the M/m gene in the cucumber plant (*Cucumis sativus* L.). *Theor Appl Genet*, 117:1253-1260.
- Lijavetzky D, Martínez MC, Carrari F, Hopp HE.** (1996). QTL analysis and mapping of pre-harvest sprouting resistance in Sorghum. *Euphytica*, 112(2):125-135.
- Lima JM, Dass A, Sahu SC, Behera L, Chauhan DK.** (2007) A RAPD marker identified a susceptible specific locus for gall midge resistance gene in rice cultivar ARC5984. *Crop Protection*, 26(9):1431-5.
- Lin J-J, Kuo J, Ma J, Saunders JA, Beard HS, Macdonald MH, Kenworthy W, Ude N, Matthews F.** (1996). Identification of molecular markers in soybean comparing RFLP, RAPD and AFLP DNA mapping techniques. *Plant Mol Biol Rep*, 14:156-169.
- Liniers.** (2007). Macanudo N°1. 6ta edición. Ediciones de la Flor. Buenos Aires, Argentina.
- Lipman D, Pearson W.** (1985). Rapid and sensitive protein similarity searches. *Science*, 227:1435-1441.
- Lipman D, Pearson W.** (1988). Improved tools for biological sequence comparison. *Proc Nat Acad Sci*, 85:2444-2448.
- Livingstone KD, Lackney VK, Blauth JR, van Wijk R, Kyle-Jahn M.** (1999). Genome mapping in *Capsicum* and the evolution of genome structure in the *Solanaceae*. *Genetics*, 152:1173-1202.
- Livneh O, Vardi E, Stram Y, Edelbaum O, Sela I.** (1992). The conversion of a RFLP assay into PCR for the determination of purity in a hybrid pepper cultivar. *Euphytica*, 62:97-102.
- Madsen LH, Collins NC, Rakwalska M, Backes G, Sandal N, Krusell L, Jensen J, Waterman EH, Jahoor A, AyliVe M, Pryor AJ, Langridge P, Schulze-Lefert P,**

- Stougaard J** (2003) Barley disease resistance gene analogs of the NBS-LRR class: identification and mapping. *Mol Genet Genomics*, 269:150–161.
- Malcuit I, Marano MR, Kavanagh TA, De Jong W, Forsyth A, Baulcombe DC.** (1999). The 25-kDa movement protein of PVX elicits *Nb*-mediated hypersensitive cell death in potato. *Mol Pl Microbe Interact*, 12:536-543.
- Malcuit I, De Jong W, Baulcombe DC, Shields DC, Kavanagh TA.** (2000). Acquisition of multiple virulence/avirulence determinants by Potato Virus X (PVX) has occurred through convergent evolution rather than through recombination. *Virus Genes*, 20:165-172.
- Marano MR, Malcuit I, De Jong W, Baulcombe DC.** (2002). High-resolution genetic map of *Nb*, a gene that confers hypersensitive resistance to potato virus X in *Solanum tuberosum*. *Theor Appl Genet*, 105:192-200.
- Marcucci Poltri S.** (1998). Caracterización molecular y cariotípica de germoplasma argentino de *Solanum* sp. *Tesis Doctoral en Ciencias Biológicas*. FCEyN, UBA. Buenos Aires, Argentina.
- Marczewski W, Ostrowska K, Zimnoch-Guzowska E.** (1998). Identification of RAPD markers linked to the *Ns* locus in potato. *Mol Breed*, 117:88-90.
- Marczewski, W., Flis, B., Syller, J., Schäfer-Pregl, R., and Gebhardt, C.** (2001). A major QTL for resistance to *Potato Leafroll Virus* (PLRV) is located in a resistance hotspot on potato chromosome XI and is tightly linked to *N* gene-like markers. *Mol Plant Microbe Interact*, 14:1420-1425.
- Marczewski W, Hennig J, Gebhardt C.** (2002). The *Potato virus S* resistance gene *Ns* maps to potato chromosome VIII. *Theor Appl Genet*, 105:564-567.
- Marczewski W, Strzelczyk-Żyta D, Hennig J, Witek K, Gebhardt C.** (2006) Potato chromosomes IX and XI carry genes for resistance to potato virus M. *Theor Appl Genet*, 112:1232-1238.
- Martin GB, Williams JGK, Tanksley SD.** (1991). Rapid identification of markers linked to a *Pseudomonas* resistance gene in tomato by using random primers and near-isogenic lines. *Proc Natl Acad Sci USA*, 88:2336-2341.
- Martin GB, Bogdanove AJ, Sessa G.** (2003). Understanding the functions of plant disease resistance proteins. *Annu Rev Plant Biol*, 54:23-61.
- Martínez MC.** (1997). Búsqueda de marcadores moleculares ligados al gen de resistencia a PVX presente en *Solanum commersonii*. *Tesis de Licenciatura en Ciencias Biológicas*. FCEyN, UBA. Buenos Aires, Argentina.
- Martínez-Crovetto, R.** (1981). Plantas utilizadas en Medicina en el NO de Corrientes. Tucumán, Argentina. *Miscelánea*, 69.
- Masson J, Lecerf M, Rouselle P, Perennec P, Pelletier G.** (1987). Plant regeneration from protoplasts of diploid potato derived from crosses of *Solanum tuberosum* with wild *Solanum* species. *Plant Science*, 53: 167-171.
- Matthews REF.** (1949). Studies on Potato Virus X II. Criteria of Relationships between strains. *Ann Appl Biol*, 36:460-474.
- Mc Gregor CE, Lambert CA, Greyling M, Louw JH, Warnich L.** (2000). A comparative assessment of DNA fingerprinting techniques (RAPD, ISSR, AFLP and SSR) in tetraploid potato (*Solanum tuberosum* L.) germplasm. *Euphytica*, 113:135-144.
- McHale L, Tan X, Koehl P, Michelmore RW.** (2006). Plant NBS-LRR proteins: adaptable guards. *Genome Biol*, 7:212.
- McLenachan PA, Stöckler K, Winkworth RC, McBreen K, Zauner S, Lockhart PJ.** (2000). Markers derived from amplified fragment length polymorphism gels for plant ecology and evolution studies. *Mol Ecol*, 9:1899-1903.

- Meudt HM, Clarke AC.** (2007). Almost forgotten or latest practice? AFLP application, analyses and advances. *Trends Pl Sc*, 12(3):106-115.
- Meyers BC, Dickerman AW, Michelmore RW, Sivaramakrishnan S, Sobral BW, Young ND.** (1999). Plant disease resistance genes encode members of an ancient and diverse protein family within the nucleotide-binding superfamily. *Plant J*, 20:317–332.
- Meyers BC, Morgante M, Michelmore RW.** (2002). TIR-X and TIR-NBS proteins: two new families related to disease resistance TIRNBS-LRR proteins encoded in *Arabidopsis* and other plant genomes. *Plant J*, 32:77–92
- Meyers BC, Kozik A, Griego A, Kuang H, Michelmore RW** (2003) Genome-wide analysis of NBS-LRR-encoding genes in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 15:809–834.
- Meyers BC, Kaushik S, Nandety RS.** (2005). Evolving disease resistance genes. *Curr Opin Plant Biol*, 8:129-134.
- Meyer S, Nagel A, Gebhardt C.** (2005). PoMaMo-a comprehensive database for potato genome data. *Nucleic Acids Res*, 33:D666-D670.
- Micheletto S, Boland R, Huarte M.** (2000). Argentinian wild diploid *Solanum* species as sources of quantitative late blight resistance. *Theor Appl Genet*, 101:902–906.
- Michelmore RW, Paran I, Kesseli RV.** (1991). Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. *Proc Natl Acad Sci USA*, 88:9828-9832.
- Michelmore RW, Meyers BC.** (1998). Clusters of resistance genes in plants evolved by divergent selection and a birth-and-death process. *Genome Res*, 8:1113-1130.
- Miklas PN, Stavely JR, Kelly JD.** (1993). Identification and potential use of a molecular marker for rust resistance in common bean. *Theor Appl Genet*, 85:745-749.
- Milbourne D, Meyer R, Bradshaw JE, Baird E, Bonard N, Provan J, Powell W, Waugh R.** (1997). Comparison of PCR-based marker systems for the analysis of genetic relationships in cultivated potato. *Mol Breed*, 3:127-136.
- Milbourne D, Meyer RC, Collins AJ, Ramsay LD, Gebhardt C, Waugh R.** (1998). Isolation, characterisation and mapping of simple sequence repeat loci in potato. *Mol Gen Genet*, 259:233-245.
- Milligan SB, Bodeau J, Yaghoobi J, Kaloshian I, Zabel P, Williamson VM.** (1998). The root knot nematode resistance gene *Mi* from tomato is a member of the leucine zipper, nucleotide binding, leucine-rich repeat family of plant genes. *Plant Cell*, 10:1307-1319.
- Moffett P, Farnham G, Peart J, Baulcombe DC.** (2002). Interaction between domains of a plant NBS-LRR protein in disease resistance-related cell death. *EMBO J*, 21:4511–4519.
- Monosi B, Wisser RJ, Pennill L, Hulbert SH.** (2004) Full-genome analysis of resistance gene homologues in rice. *Theor Appl Genet*, 109:1434-1447.
- Moreira A, Jones RAC, Fribourg CE.** (1980). Properties of a resistance-breaking strain of potato virus X. *Ann Appl Biol*, 95: 93-103.
- Morgante M, Olivieri AM.** (1993). PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. *Plant J*. 3: 175-182.
- Mosciaro M.** (2004). Caracterización de la producción y comercialización de la papa en Argentina. Área de Economía y Sociología Rural, INTA-Balcarce. <http://www.inta.gov.ar/balcarce/info/documentos/htm>.
- Nair S, Kumar A, Srivastava M, Mohan M.** (1996). PCR-based DNA markers linked to a gall midge resistance gene, *Gm4t*, has potential for marker-aided selection in rice. *Theor Appl Genet*, 92: 660-665.

- Nicod J-C, Largiadèr CR.** (2003). SNPs by AFLP (SBA): a rapid SNP isolation strategy for non-model organism. *Nucleic Acids Res*, 31:e19.
- Niño-Liu DO, Zhang L, Foolad MR.** (2003) Sequence comparison and characterization of mapped RGA markers in tomato. International Horticultural Congress N°26, Toronto, Canadá. (11/08/2002). *Acta Hort*, 625:49-58.
- Nobuta K, Ashfield T, Kim S, Innes RW.** (2005). Diversification of non-TIR class NB-LRR genes in relation to whole genome duplication events in Arabidopsis. *Mol Plant Microbe Interact*, 18:103-109.
- Norero N, Malleville J, Huarte M, Feingold S.** (2004) Cost efficient potato (*Solanum tuberosum* L.) cultivar identification by microsatellite amplification. *Potato Res*, 45:131-138.
- Nürberger T, Brunner F, Kemmerling B, Piater L.** (2004). Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences. *Immunol Rev*, 198:249-266.
- Nyman M, Waara S.** (1997). Characterization of somatic hybrids between *Solanum tuberosum* and its frost-tolerant relative *Solanum commersonii*. *Theor Appl Genet*, 95:1127-1132.
- Pan Q, Liu YS, Budai Hadrian O, Sela M, Carmel Goren L.** (2000). Comparative genetics of nucleotide binding site-leucine rich repeat resistance gene homologues in the genomes of two dicotyledons: tomato and *Arabidopsis*. *Genetics*, 155:309-322.
- Pajeroska KM, Parker JE, Gebhardt C.** (2005). Potato homologs of *Arabidopsis thaliana* genes functional in defense signaling-identification, genetic mapping and molecular cloning. *Mol Plant Microbe Interact*, 18(10):1107-1119.
- Paran I, Michelmore RW.** (1993). Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. *Theor Appl Genet*, 85: 985-993.
- Paran I, van der Voort JR, Lefebvre V, Jahn M, Landry L, van Schriek M, Tanyolac B, Caranta C, Ben Chaim A, Livingstone K, Palloix A, Peleman J.** (2004.) An integrated genetic linkage map of pepper (*Capsicum* spp.). *Mol Breed*, 13:251-261.
- Parrella G, Cardi T.** (1999). Transfer of a new PVX resistance gene from *Solanum commersonii* to *S. tuberosum* through somatic hybridization. *J Genet Breed*, 53:359-362.
- Peakall R, Gilmore S, Keys W, Morgante M, Rafalski A.** (1998). Cross-species amplification of soybean (*Glycine max*) simple sequence repeats (SSRs) within the genus and other legume genera: Implications for the transferability of SSRs in plants. *Mol Biol Evol*, 15:1275-1287.
- Penner GA, Chong J, Lévesque-Lemay M, Molnar SJ, Fedak G.** (1993). Identification of a RAPD marker linked to the oat stem rust gene *Pg3*. *Theor Appl Genet*, 85:702-705.
- Pflieger S, Palloix A, Caranta C, Blattes A, Lefebvre V.** (2001). Defense response genes co-localize with quantitative disease resistance loci in pepper. *Theor Appl Genet*, 103:920-929.
- Pillen K., Ganal MW, Tanksley SD.** (1996). Construction of a high-resolution genetic map and YAC-contigs in the tomato Tm-2a region. *Theor Appl Genet*, 93:228-233.
- Plioger S, Lefebvre V, Causse M.** (2001). The candidate gene approach in plant genetics: a review. *Mol Breed*, 7:275-291.
- Powell W, Machray GC, Provan J.** (1996). Polymorphism revealed by simple sequence repeats. *Trends Plant Sci*, 1:215-222.
- Provan J, Powell W, Waugh R.** (1996). Microsatellite analysis of relationships within cultivated potato (*Solanum tuberosum*). *Theor Appl Genet*, 92:1078-1084.
- Querci M, van der Vlugt, Goldblach R, Salazar LF.** (1993). RNA sequence of potato virus X strain HB. *J Gen Virol*, 74:2251-2255.

- Quint M, Mihaljevic R, Dussle CM, Xu ML, Melchinger AE, Lübberstedt T.** (2002). Development of RGA-CAPS markers and genetic mapping of candidate genes for sugarcane mosaic virus resistance in maize. *Theor Appl Genet*, 105:355-363.
- Rairdan GJ, Moffett P.** (2006). Distinct domains in the ARC region of the potato resistance protein Rx mediate LRR binding and inhibition of activation. *Plant Cell*, 18:2082–2093.
- Raker C, Spooner DM.** (2002). The Chilean tetraploid cultivated potato, *Solanum tuberosum*, is distinct from the Andean populations; microsatellite data. *Crop Sci*, 42:1451-1458.
- Ramalingam J, Vera Cruz C M, Kukreja K, Chittoor JM, Wu JL, Lee SW, Baraoidan M, George ML, Cohen MB, Hulbert SH, Leach JE, Leung H.** (2003). Candidate defense genes from rice, barley, and maize and their association with qualitative and quantitative resistance in rice. *Mol Plant Microbe Interact*, 16:14-24.
- Rathjen JP, Moffett P.** (2003). Early signal transduction events in specific plant disease resistance. *Curr Opin Plant Biol*, 6:300–306.
- Ratnaparkhe MB, Santra DK, Tullu A, Muehlbauer FJ.** (1998). Inheritance of inter-simple-sequence-repeat polymorphisms and linkage with fusarium wilt resistance gene in chickpea. *Theor Appl Genet*, 96:348-353.
- Ravin NV, Mardanova ES, Kotlyarov RY, Novikov VK, Atabekov JG, Skryabi KG.** (2008). Complete sequencing of Potato Virus X new strain genome and construction of viral vector for production of target proteins in plants. *Biochemistry (Moscow)*, 73, 44-49.
- Richly E, Kurth J, Leister D.** (2002). Mode of amplification and reorganization of resistance genes during recent *Arabidopsis thaliana* evolution. *Mol Biol Evol*, 19:76-84.
- Ritter E, Debener T, Barone A, Salamini F, Gebhardt C.** (1991). RFLP mapping on potato chromosomes of two genes controlling extreme resistance to potato virus X (PVX). *Mol Gen Genet*, 227:81-85.
- Ross H.** (1986). Potato breeding -problems and perspectives. Brandes J, Bartels R, Völk J, Wetter C (eds). *Advances in Plant Breeding. J. Plant Breed*, 13 (suplemento). Verlag Paul Parey, Berlin, Alemania.
- Ross H, Baerecke ML.** (1950). III. Selection for resistance to mosaic virus (Diseases) in wild species and in hybrids of wild species of potatoes. *Am Pot J*, 27: 275-284.
- Rossi M, Araujo PG, Paulet F, Garsmeur O, Dias VM, Chen H, Van Sluys MA, D’Hont A** (2003) Genomic distribution and characterization of EST-derived resistance gene analogs (RGAs) in sugarcane. *Mol Gen Genomics*, 269:406-419.
- Roupe van der Voort JNAM, Wolters P, Hutten R, van Zandvoort P, van Eck HJ, Folkertsma RT, Hutten RBC, Draaistra J, Gommers FJ, Jacobsen E, Helder J, Bakker J.** (1997a). Use of allele specificity of comigrating AFLP markers to align genetic maps from different potato genotypes. *Mol Gen Gene*, 255:438-447.
- Roupe van der Voort JNAM, Wolters P, Folkertsma R, Hutten R, van Zandvoort P, Vinke H, Kanyuka K, Bendahmane A, Jacobsen E, Janssen R, Bakker J.** (1997b). Mapping of the nematode resistance locus *Gpa2* in potato using a strategy based on comigrating AFLP markers. *Theor Appl Genet*, 95:874–880.
- Roupe van der Voort JNAM, van Eck HJ, Draaistra J, van Zandvoort PM, Jacobsen E, Bakker J.** (1998). An online catalogue of AFLP markers covering the potato genome. *Mol Breeding*, 4:73-77.
- Roupe van der Voort JR.** (1998). Mapping genetic factors controlling potato/cyst nematode interactions. Ph.D. thesis. Wageningen Agricultural University, Wageningen, Países Bajos.

- Roupe van der Voort JR., Kanyuka K, van der Vossen E, Bendahmane A, Mooijman P, Klein-Lankhorst R, Stiekema W, Baulcombe D, Bakker J.** (1999). Tight physical linkage of the nematode resistance gene *Gpa2* and the virus resistance gene *Rx* on a single segment introgressed from the wild species *Solanum tuberosum* subsp. *andigena* CPC 1673 into cultivated potato. *Mol Plant Microbe Interact*, 12:197-206.
- Rozen S, Skaletsky H.** (2000). Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol*, 132:365-386.
- Rudd S.** (2003). Expressed sequence tags: alternative or complement to whole genome sequences?. *Trends Plant Sci*, 8:321-329.
- Ruffel S, Dussault MH, Palloix A, Moury B, Bendhamane A, Robaglia C, Caranta C.** (2002). A natural recessive resistance gene against potato virus Y in pepper corresponds to the eukaryotic initiation factor 4e(eIF4e). *Plant J*, 32:1067-1075.
- Saghai-Marroof MA, Solima KM, Jorgenson RA, Allard RW.** (1994). Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. *Proc Natl Acad Sci USA*, 81:8014-8018.
- Salaman RN.** (1938). The potato virus 'X': its strains and reactions. *Philos. Trans. R. Soc. London Ser. B* 229:137-217.
- Salazar L.** (2005). Situación actual de la virosis en papa. *XIII Congreso Latinoamericano de Fitopatología*. Villa Carlos Paz, Córdoba, Argentina.
- Salazar LF, Accatino P.** (1990). The importance of potato virus diseases in developing countries. *Control of virus and virus-like diseases of potato and sweet potato*. Report of the III Planing Conference, Lima, Peru, 20-22 Nov. 1989 21-28. CIP, Internacional Potato Center, Lima, Perú.
- Salmeron JM, Barker SJ, Carland FM, Mehta AY, Staskawicz BJ.** (1994). Tomato mutants altered in bacterial disease resistance provide evidence for a new locus controlling pathogen recognition. *Plant Cell*, 6(4):511-520.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T.** (1989). *Molecular Cloning: laboratory manual*. 2da edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York, EUA.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR.** (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 74:5463-5467.
- Santa Cruz S, Roberts AG, Prior DA, Chapman S, Oparka KJ.** (1998) Cell-to-cell and phloem-mediated transport of potato virus X. The role of virions. *Plant Cell*, 10: 495-510.
- Sato M, Nichikawa K, Komura K, Hosaka K.** (2006). *Potato virus Y* resistance gene, *Ryhc*, mapped to the distal end of potato chromosome 9. *Euphytica*, 149:367-372.
- Schlötterer C.** (2004). The evolution of molecular markers-just a matter of fashion? *Nat Rev Genet*, 5:63-69.
- Schneider K, Douches DS.** (1997). Assessment of PCR-based simple sequence repeats to fingerprint North American potato cultivars. *Am Potato J*, 74:149-160.
- Schultz ES, Raleigh WP.** (1933). Resistance of potato to latent mosaic. *Phytopathology*, 23:32-32.
- Schultz ES, Clark CF, Stevenson FJ, Raleigh WP.** (1937). Resistance of the potato to latent mosaic *Am Potato J*, 14:124-127.
- Shen KA, Meyers BC, Islam-Faridi MN, Chin DB, Stelly DM, Michelmore RW.** (1998). Resistance gene candidates identified by PCR with degenerate oligonucleotide primers map to clusters of resistance genes in lettuce. *Mol Plant Microbe Interact*, 11:815-823.

- Shirasawa K, Kishitani S, Nishio T.** (2004). Conversion of AFLP markers to sequence-specific markers for closely related lines in rice by use of the rice genome sequence. *Mol Breed*, 14:283-292.
- Shizuya H, Birren B, Kim UJ, Mancino V, Slepak T, Tachiri Y, Simon M.** (1992). Cloning and stable maintenance of 300-kilobase pair fragments of human DNA in *Escherichia coli* using an F-factor-based vector. *Proc Natl Acad Sci USA*, 89:8794-8797.
- Simko I, Costanzo S, Haynes KG, Christ BJ, Jones RW.** (2004a). Linkage disequilibrium mapping of a *Verticillium dahliae* resistance quantitative trait locus in tetraploid potato (*Solanum tuberosum*) through a candidate gene approach. *Theor Appl Genet*, 108:217-224.
- Simko I, Haynes KG, Ewing EE, Costanzo S, Christ BJ, Jones RW.** (2004b). Mapping genes for resistance to *Verticillium albo-atrum* in tetraploid and diploid potato populations using haplotype association tests and genetic linkage analysis. *Mol Gen Genomics*, 271:522-531.
- Śliwka J, Jakuczun H, Lebecka R, Marczewski W, Gebhardt C, Zimnoch-Guzowska E.** (2006). The novel, major locus *Rpi-phul* for late blight resistance maps to potato chromosome IX and is not correlated with long vegetation period. *Theor Appl Genet*, 113: 685-695.
- Smilde WD, Brigneti G, Lager L, Perkins S, Jones JDG.** (2005). *Solanum mochiquense* chromosome IX carries a novel late blight resistance gene *Rpi-moc1*. *Theor Appl Genet*, 110: 252-258.
- Sobral BWS, Honeycutt RJ.** (1993). High output genetic mapping of polyploids using PCR-generated markers *Theor Appl Genet*, 86:105-112.
- Solomon-Blackburn RM, Barker H.** (2001a). A review of host major-gene resistance to potato virus X, Y, A and V in potato: genes, genetics and mapped locations. *Heredity*, 86:8-16.
- Solomon-Blackburn RM, Barker H.** (2001b). Breeding virus resistant potatoes (*Solanum tuberosum*): a review of traditional and molecular approaches. *Heredity*, 86:17-35.
- Song J, Dong F, Jiang J** (2000). Construction of a bacterial artificial chromosome (BAC) library for potato molecular cytogenetics research. *Genome*, 43:199–204.
- Song J, Dong F, Lilly JW, Stupar RM, Jiang J.** (2001). Instability of bacterial artificial chromosome (BAC) clones containing tandemly repeated DNA sequences. *Genome*, 44:463-469.
- Song J, Bradeen JM, Naess SK, Helgeson JP, Jiang J.** (2003a). BIBAC and TAC clones containing potato genomics DNA fragments larger than 100 kb are not stable in *Agrobacterium*. *Theor Appl Genet*, 107:958-964.
- Song J, Bradeen JM, Naess SK, Raasch JA, Wielgus SM, Haberlach GT, Liu J, Kuang H, Austin-Phillips S, Buell CR, Helgeson JP, Jiang J.** (2003b). Gene *RB* cloned from *Solanum bulbocastanum* confers spectrum resistance to potato late blight. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100:9128–9133.
- Soriano JM, Vilanova S, Romero C, Llacer G, Badenes ML.** (2005). Characterization and mapping of NBS-LRR resistance gene analogs in apricot (*Prunus armeniaca* L.). *Theor Appl Genet*, 110:980-989.
- Southern EM.** (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol*, 98:503-517.
- Spassova MI, Prins TW, Folkertsma RT, Klein-Lankhorst RM, Hille J, Goldbach RW, Prins M.** (2001). The tomato gene *Sw5* is a member of the coiled coil, nucleotide binding, leucine-rich repeat class of plant resistance genes and confers resistance to TSWV in tobacco. *Molecular Breeding*, 7:151–161.

- Spooner DM, Clausen AM.** (1993). Wild potato (*Solanum* sect. *Petota*) germplasm collecting expedition to Argentina in 1990, and status of Argentinian potato germplasm resources. *Potato Res*, 36:3-12.
- Spooner DM, Núñez J, Trujillo G, Herrera MR, Guzmán F, Ghislain M.** (2007). Extensive simple sequence repeat genotyping of potato landraces supports a major reevaluation of their gene pool structure and classification. *Proc Natl Acad Sci USA*, 104(49):19398-19403.
- Stevens MR, Scott SJ, Gergerich RC.** (1992). Inheritance of a gene for resistance to tomato spotted wilt virus (TSWV) from *Lycopersicon peruvianum* Mill. *Euphytica*, 59:9-17.
- Stevens MR, Lamb EM, Rhoads DD.** (1995). Mapping the *Sw-5* locus for tomato spotted wilt virus resistance in tomatoes using RAPD and RFLP analyses. *Theor Appl Genet*, 90: 451-456.
- Szajo K, Chrzanowska M, Witek K, Strzelczyk-Zyta D, Zagórska H, Gebhardt C, Hennig J, Marczewski W.** (2008). The novel gene *Ny-1* on potato chromosome IX confers hypersensitive resistance to *Potato virus Y* and is an alternative to *Ry* genes in potato breeding for PVY resistance. *Theor Appl Genet*, 116: 297-303.
- TAGI: The Arabidopsis Genome Initiative.** (2000). Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature*, 6814:796-815.
- Takken FLW, Albrecht M, Tameling WIL.** (2006). Resistance proteins: molecular switches of plant defense. *Curr Opin Plant Biol*, 9:383-390.
- Tanksley SD, Ganai MW, Prince JP, de Vicente MC, Bonierbale MW, Broun P, Fulton TM, Giovannoni JJ, Grandillo S, Martin GB, Messeger R, Miller JC, Miller L, Paterson AH, Pineda O, Röder MS, Wing RA, Wu W, Young ND.** (1992). High density molecular linkage maps of the tomato and potato genomes. *Genetics*, 132:1141-1160.
- Tao Q, Chang Y-L, Wang J, Chen H, Isalam-Faridi MN, Scheuring C, Wang B, Stelly DM, Zhang H-B.** (2001). Bacterial artificial chromosome-based physical map of the rice genome constructed by restriction fingerprint analysis. *Genetics*, 158:1711-1724.
- Thomas CM, Vos P, Zabeau M, Jones DA, Norcott KA, Chadwick BP, Jones JD.** (1995). Identification of amplified restriction fragment polymorphism (AFLP) markers tightly linked to the tomato Cf-9 gene for resistance to *Cladosporium fulvum*. *Plant J*, 8:785-794.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ.** (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res*, 22:4673-4680.
- Tingey SV, Rafalski JA, Hanafey MK.** (1994). Genetic analysis with RAPD markers. Coruzzi G, Puigdomenech P (eds). *Plant Molecular Biology: Molecular-Genetic Analysis of Plant Development and Metabolism*. NATO ASI Series, H81. Springer-Verlag, Mallorca, España.
- Tommiska TJ, Hämäläinen JH, Watanabe KN, Valkonene JPT.** (1998). Mapping of the gene *Nxphu* that controls hypersensitive resistance to potato virus X in *Solanum phureja* Ipv35. *Theor Appl Genet*, 96:840-843.
- Toursarkissian, M.** (1980). Plantas medicinales de la Argentina. Editorial Hemisferio Sur. Buenos Aires, Argentina.
- Tozzini AC.** (1994). Identificación y Caracterización de Mecanismos de Resistencia al Virus X de la Papa en Germoplasma de *Solanum*. *Tesis de Maestría*. FA, UBA. Buenos Aires, Argentina.
- Tozzini AC.** (1997). Identificación y análisis molecular de una cepa hipervirulenta de PVX, PVX MS y estudio de las modificaciones postraduccionales de la proteína de

- cápside de PVX. *Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas*. FCEyN, UBA. Buenos Aires, Argentina.
- Tozzini AC, Ceriani MF, Saladrigas MV, Hopp HE.** (1991). Extreme resistance to infection by potato virus X in genotypes of wild tuber-bearing *Solanum* species *Potato Res*, 34:317-324.
- Tozzini AC, Ceriani MF, Cramer P, Palva ET, Hopp HE.** (1994). PVX MS, a new strain of potato virus that overcomes the extreme resistance gene *Rx*. *J Phytopath*, 141(3):241-248.
- Tragoonrung S, Kanazin P, Hayes M.** (1992). Sequence-tagged-site-facilitated PCR for barley genome mapping. *Theor Appl Genet*, 84:1002-1008.
- Trognitz FCh, Trognitz BR.** (2005). Survey of resistance gene analogs in *Solanum caripense*, relative of potato and tomato, an update on *R* gene genealogy. *Mol Gen Genomics*, 274:595-605.
- Valkonen JPT, Jones RAC, Slack SA, Watanabe KN.** (1996). Resistance specificities to virus in potato: standardization of nomenclature. *Pl Breed*, 115:433-438.
- van der Beek JG, Pet F, Lindhout P.** (1994). Resistance to powdery mildew (*Oidium lycopersicum*) is controlled by an incomplete dominant gene *Ol-1* on chromosome 6. *Theo. Appl Genet*, 89: 467-73.
- van der Biezen EA, Jones JDG.** (1998). The NB-ARC domain: a novel signaling motif shared by plant disease resistance gene products and regulators of cell death in animals. *Curr Biol*, 8:R226-227.
- van der Biezen EA, Jones JDG.** (1999). Plant disease-resistance proteins and the gene-for-gene concept. *Trends Biochem Sci*, 23:454-456.
- van der Linden CG, Wouters DC, Mihalka V, Kochieva EZ, Smulders MJ, Vosman B.** (2004). Efficient targeting of plant disease resistance loci using NBS profiling. *Theor Appl Genet*, 109:384-393.
- van der Vossen EAG, Rouppe van der Voort JNAM, Kanyuka K, Bendahmane A, Sandbrink H, Baulcombe DC, Bakker J, Stiekema WJ, Klein-Lankhorst RM.** (2000). Homologues of a single resistance-gene cluster in potato confer resistance to distinct pathogens: a virus and a nematode. *Plant J*, 23(5):567-576.
- van der Vossen E, Sikkema A, hekkert B, Gros J, Stevens P, Muskens M, Wouters D, Pereira A, Stiekema W, Allefs S.** (2003). An ancient *R* gene 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 Eck HJ, Rouppe van der Voort J, Draaistra J, van Zandvoort P, van Enckevort E, Segers B, Peleman J, Jacobsen E, Helder J, Bakker J.** (1995). The inheritance and chromosomal localization of AFLP markers in a non-inbred potato offspring. *Mol Breed*, 1:397-410.
- van Ooijen G, van den Burg HA, Cornelissen BJC, Takken FLW.** (2007). Structure and function of resistance proteins in solanaceous plants. *Annu Rev Phytopathol*, 45:43-72.
- Van Os H, Andrzejewski S, Bakker E, Barrena I, Bryan GJ, Caromel B, Ghareeb B, Isidore E, de Jong W, van Koert P, Lefebvre V, Milbourne D, Ritter E, Rouppe van der Voort JNAM, Rousselle-Bourgeois F, van Vliet J, Waugh R., Visser RGF, Bakker J, van Eck HJ.** (2006). Construction of a 10,000-marker ultradense genetic recombination map of potato: providing a framework for accelerated gene isolation and a genome wide physical map. *Genetics*, 173:1075-1087.
- Vázquez A, González G, Ferreira F, Moyana P, Kenne L.** (1997). Glycoalkaloids of *Solanum commersonii* Dun. ex Poir. *Euphytica*, 95:195-201

- Veilleux RE, Shen LY, Paz MM.** (1995). Analysis of the genetic composition of anther-derived potato by randomly amplified polymorphic DNA and simple sequence repeats. *Genome*, 38:1153-1162.
- Velásquez AC, Mihovilovich E, Bonierbale M.** (2007) Genetic characterization and mapping of major gene resistance to potato leafroll virus in *Solanum tuberosum* ssp. *andigena*. *Theor Appl Genet*, 114:1051-1058.
- Verchot-Lubicz J.** (2005) Invited Review: A new cell-to-cell transport model for Potexviruses. *Mol Pl Microbe Interact*, 18: 283-290.
- Verchot-Lubicz J, Ye C-M, Bamunusinghe D.** (2007). Molecular biology of potexvirus: recent advances. *J Gen Virol*, 88:1643-1655.
- Vigliola MI.** (1986). *Manual de Horticultura*. Editorial Hemisferio Sur, Buenos Aires, Argentina.
- Vincze T, Posfai J, Roberts RJ.** (2003). NEBcutter: a program to cleave DNA with restriction enzymes. *Nucleic Acids Res*, 31:3688-3691.
- Voinnet O.** (2005). Induction and suppression of RNA silencing: insights from viral infections. *Nat Rev Genet*, 6:206-220.
- Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, van de Lee T, Hornes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M, Zabeau M.** (1995). AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res*, 23:4407-4414.
- Wang GL, Holsten TE, Song WY, Wang HP, Ronald PC.** (1995). Construction of a rice bacterial artificial chromosome library and identification of clones linked to the *Xa-21* disease resistance locus. *Plant J*, 7:525-533.
- Wang Z, Taramino G, Yang D, Liu G, Tingey SV, Miao GH, Wang GL.** (2001). Rice ESTs with disease-resistance gene or defense response gene-like sequences mapped to regions containing major resistance genes or QTLs. *Mol Genet Genomics*, 265:302-310.
- Weaver KR, Caetano-Anollés G, Gresshoff PM, Callahan LM.** (1994). Isolation and cloning of DNA amplification products from silver-stained polyacrylamide gels. *BioTechniques*, 16:226-227.
- Welsh J, McClelland M.** (1990). Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res*, 18:7213-7218.
- Welsh J, McClelland M.** (1991). Genomic fingerprintings produced by PCR with consensus rRNA gene primers. *Nucleic Acids Res*, 19:861-866.
- Westman AL, Kresovich S.** (1998). The potential of cross-taxa simple-sequence repeat (SSR) amplification between *Arabidopsis thaliana* L. and crop brassicas. *Theor Appl Genet*, 96:272-281.
- Whitham S, Dinesh-Kumar SP, Choi D, Hehl R, Corr C, Baker B.** (1994). The product of the tobacco mosaic virus resistance gene *N*: similarity to toll and the interleukin-1 receptor. *Cell*, 78:1101-1115.
- Whitham SA, Yang Ch, Goodin MM.** (2006). Global impact: elucidating plant responses to viral infection. *Mol Pl Microbe Interact*, 19:1207-1215.
- Williams JGH, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV.** (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res*, 18:6531-6535.
- Woo SS, Jian J, Gill BS, Paterson AH, Wing RA.** (1994). Construction and characterization of a bacterial artificial chromosome library of Sorghum bicolor. *Nucleic Acids Res*, 22:4922-4931.
- Xiao WK, Xu ML, Zhao JR, Wang FG, Li JS, Dai JR.** (2006). Genome-wide isolation of resistance gene analogs in maize (*Zea mays* L.). *Theor Appl Genet*, 113:63-72.
- Xiao WK, Zhao JR, Fan S, Li L, Dai JR, Xu M.** (2007). Mapping of genome-wide resistance gene analogs (RGAs) in maize (*Zea mays* L.). *Theor Appl Genet*, 115:501-508.

- Yang D, Sanchez A, Khush GS, Zhu Y, Huang N.** (1998). Construction of a BAC contig containin the *Xa5* locus in rice. *Theor Appl Genet*, 97:1120-1124.
- Yoshimura S, Umehara Y, Kurata N, Nagamura Y, Sasaki T, Minori Y, Iwata N.** (1996). Identification of a YAC clone carrying the *Xa-1* allele, a bacterial blight resistance gene in rice *Theor Appl Genet*, 93:117-122.
- You M., Boersma JG, Buirchell BJ, Sweetingham MW, Siddique KH, Yang H.** (2005). A PCR-based molecular marker applicable for marker-assisted selection for anthracnose disease resistance in lupin breeding. *Cell Mol Biol Lett*, 10:123–134.
- Yu YG, Saghai Buss GR, Maroof MA.** (1996). Isolation of a superfamily of candidate disease-resistance genes in soybean based on a conserved nucleotide-binding site. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93:11751–11756.
- Zabeau M, Vos P.** (1993). *European Patent Application Number: 92402629.7, Publication Number 0 534 858 A1.*
- Zaitzev VS, Naroditsky BS, Khavikin EE.** (2002). Homologs of the genes for receptor-like kinase proteins conferring plant resistance to pathogens: resistance gene homologs in *Solanum* species. *Russ J Plant Physiol*, 49(6):810-816.
- Zamir D.** (2001) Improving plant breeding with exotic genetic libraries. *Nat Rev Genet*, 2:983-989
- Zhang H-B, Choi S, Woo S-S, Li Z, Wing RA.** (1996). Construction and characterization of two rice bacterial artificial chromosome libraries from the parents of a permanent recombinant inbred mapping population. *Mol Breed*, 2:11-24.
- Zhang H, Valkonen JPT, Watanabe KN.** (2003). A bacterial artificial chromosome (BAC) library for potato and identification of clones related to the Potato Y Potyvirus resistance gene *Ry^{adg}*. *Breeding Sci*, 53:155-161.
- Zhang Z, Xu S, Xu Q, Larkin P, Xin Z.** (2004). Development of novel PCR markers linked to the BYDV resistance gene *Bdv2* useful in wheat for marker-assisted selection. *Theor Appl Genet*, 109:433-439
- Zhang J, Yuan Y, Niu C, Hinchliffe DJ, Lu Y, Yu S, Percy RG, Ulloa M, Cantrell RG.** (2007). AFLP-RGA markers in comparition with RGA and AFLP in cultivated tetraploid cotton. *Crop Sci*, 47:180-187.
- Zhou T, Wang Y, Chen JQ, Araki H, Jing Z, Jiang K, Shen J, Tian D.** (2004) Genome-wide identification of NBS genes in *japonica* rice reveals significant expansion of divergent non-TIR NBS-LRR genes. *Mol Genet Genomics*, 271:402-415.
- Zhu H, Cannon SB, Young ND, Cook DR.** (2002). Phylogeny and genomic organization of the TIR and non-TIR NBS-LRR resistance gene family in *Medicago truncatula*. *Mol Pl Microbe Interact*, 15:529-539.
- Zipfel C, Felix G.** (2005). Plants and animals: a different taste for microbes? *Curr Opin Plant Biol*, 8:353-360.