

IDENTIFICACIÓN Y MAPEO DE AFLPS LIGADOS AL GEN DE RESISTENCIA AL PVX EN *Solanum commersonii*¹

Mónica Blanco*, Roberto Valverde^{2/*}

Palabras clave: Papa, *Solanum commersonii*, resistencia a virus, *Virus X de la papa*, PVX, AFLP, BSA, ELISA.
Keywords: Potato, *Solanum commersonii*, virus resistance, *Potato Virus X*, PVX, AFLP, BSA, ELISA.

Recibido: 16/05/05

Aceptado: 14/07/05

RESUMEN

Solanum commersonii es una especie silvestre de papa considerada como una fuente de genes de resistencia al PVX. Para identificar marcadores moleculares relacionados con los genes de resistencia a este virus, se realizó un análisis en el que se combinó la técnica de BSA con el uso de AFLPs. Del cruce de 2 padres heterocigotos y resistentes al PVX, provenientes de una F₁, se obtuvo una F₂. La población fue inoculada con el PVX_{MS} y 30 días después mediante un ELISA, la progenie fue dividida en individuos infectados y no infectados con el PVX_{MS}; a estos 2 grupos se les realizó un BSA. El ADN de los individuos resistentes fue mezclado aparte del ADN de los individuos susceptibles y con la ayuda de AFLPs se logró identificar 22 combinaciones de imprimadores que produjeron bandas específicas relacionadas con el carácter de resistencia al PVX. Las combinaciones de imprimadores seleccionadas fueron utilizadas para evaluar cada uno de los individuos de la F₂ en forma independiente. Producto de este análisis se obtuvo 63 bandas polimórficas relacionadas al carácter de resistencia, cuya información fue introducida en el programa MAPRF6. Como resultado se obtuvo 4 grupos de ligamiento. Se encontró un RGA, obtenido en otro estudio que co-segrega (0 cM)

ABSTRACT

Identification and mapping of AFLPs linked to the PVX resistance gene in *Solanum commersonii*. *Solanum commersonii* has been identified as a source of resistance to PVX. In order to identify molecular markers related to resistant genes a combination of BSA and AFLP techniques was used. An F₂ population was obtained from crossing two F₁ heterozygous parents resistant to PVX. The F₂ was inoculated with the PVX_{MS}. Thirty days after inoculation, an ELISA test was carried out, by which the progeny was divided into resistant and susceptible individuals to the PVX_{MS}; with this information a BSA was conducted on both groups. DNA from all resistant individuals was subjected to a BSA aimed by AFLPs. The BSA allowed the identification of resistance-specific bands with 22 out of 64 primer combinations. Those primer combinations selected were used to analyze each individual of the whole F₂ population. The analysis yielded 63 polymorphic bands related to resistance; with those bands information and the MAPRF6 program, it was possible to generate 4 linkage groups with a total of 23 markers, including some RGAs from another study. In one of the linkage groups, an RGA is co-segregating (0 cM) with the extreme resistance gene (*Rx*) locus and AFLPs 42 and 39 are surrounding the

1/ Este trabajo forma parte de la tesis de M.Sc. de la autora. Programa de Estudios de Posgrado en Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales. Facultad de Ciencias Agroalimentarias. Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica.

2/ Autor para correspondencia. Correo electrónico: robertov@cariari.ucr.ac.cr

* Centro de Investigaciones Agronómicas Universidad de Costa Rica.

con el locus del gen de resistencia extrema (*Rx*) y los AFLPs 42 y 39 que están rodeando el mismo locus a 22,6 cM o más. La información obtenida será básica para implementar programas de selección asistida por marcadores moleculares en el mejoramiento genético.

INTRODUCCIÓN

La papa es un alimento importante en la dieta del ser humano debido a su alto contenido de proteína. Ocupa el quinto lugar en consumo mundial humano y el cuarto en producción mundial después del trigo, el arroz y el maíz. Para el año 2000, el área mundial sembrada alcanzó alrededor de 20,3X10⁶ ha, con una producción de 312,2X10⁶ toneladas (Estrada 2000, FAO 1995). Su centro de origen está localizado en México y Sur América (Smith 1995, Hawkes 1991). La expansión y el intercambio del cultivo, en principio desde su centro de origen, y luego entre la mayoría de los países donde se cultiva, ha facilitado la dispersión de plagas y patógenos relacionadas con este cultivo (Estrada 2000).

En las especies de papa domesticadas la diseminación de plagas y patógenos presenta un serio inconveniente; sin embargo, se ha encontrado especies silvestres que contienen genes relacionados con la resistencia a estos patógenos. Se cree que éstas plantas han surgido principalmente por una co-evolución entre los patógenos o plagas y las especies silvestres, en un ambiente sin influencia del ser humano (Salas *et al.* 2001, Estrada 2000).

La identificación, caracterización y más recientemente, clonación molecular de genes relacionados con procesos de defensa de las plantas, ha sido posible gracias a técnicas de biotecnología modernas tales como los marcadores moleculares de ADN. Mediante los marcadores ha sido posible construir mapas genéticos a partir de los cuales se facilita la identificación de aquellos genes que controlan características agronómicas relacionadas con la defensa de las plantas. Algunos de los marcadores más comúnmente utilizados para

Rx locus at a distance of 22.6 cM or more. These data will provide the foundation for molecular marker assisted selection in potato breeding programs.

este fin son, RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), SSR (Simple Sequence Repeat) y RGA (Resistance gene analogs) (Durrant *et al.* 2000, Dewal *et al.* 2000, Forapani *et al.* 1999, Gebhardt *et al.* 1999, Leister *et al.* 1998, Valverde 1998, Karp *et al.* 1997).

La técnica descrita por Vos *et al.* (1995), denominada AFLP, se considera una de las más rápidas y de menor costo. Se basa en la amplificación selectiva de fragmentos de restricción digeridos a partir del ADN genómico total, utilizando PCR (Polymerase Chain Reaction) (Williams *et al.* 1990). Los AFLPs pueden producir patrones de complejidad variada de acuerdo al tipo de enzimas de restricción y la longitud de los imprimadores utilizados en el PCR. Los AFLP son marcadores que segregan de forma mendeliana, igual que los RFLP. Sin embargo, los RFLP no logran detectar la cantidad de loci que se puede encontrar mediante la técnica de AFLP.

Otro tipo de marcador que se ha utilizado últimamente para identificar secuencias ligadas a un gen de interés, es el conocido como RGA. Estos utilizan la estrategia del PCR para amplificar motivos conservados tales como "Nucleotide binding site-Leucine rich repeats" (NBS-LRR). En tabaco y *Arabidopsis thaliana* se diseñó oligonucleótidos (*N* y *RPS2*, respectivamente) sobre las secuencias de los motivos conservados para genes de resistencia, y se logró relacionar estos RGAs con el locus de resistencia al nematodo *Globodera* sp (*Gro1*) y con el locus *R7* de resistencia a *Phytophthora infestans* de la papa (Rajesh *et al.* 2002, Leister *et al.* 1998).

Mediante el uso de los marcadores moleculares se ha podido identificar numerosos genes

de resistencia en el germoplasma de *Solanum* spp., entre los más importantes están el *Nx* y el *Nb* relacionados con una reacción hipersensible por parte de la planta y los genes *Rx* relacionados con respuestas de resistencia extrema (Zaitlin y Palukaitis 2000, Querci *et al.* 1995). Los genes *Rx* se conocen porque actúan de forma tal que suprimen la acumulación y dispersión del virus en la planta.

En el caso del PVX, han sido identificadas 2 razas conocidas como PVX_{HB} y PVX_{MS}, donde la PVX_{MS} es considerada la más virulenta; de hecho, existen reportes que indican que esta raza tiene la capacidad de superar no solo la resistencia mediada por los genes *Nx* y *Nb*, sino también la mediada por los genes de resistencia extrema *Rx* (Bendahmane *et al.* 1999, Bendahmane *et al.* 1995, Kavanagh *et al.* 1992, Ritter *et al.* 1991). Posiblemente, esta característica ha ayudado a que el PVX sea uno de los virus que se ha logrado dispersar más rápidamente en el cultivo de la papa (Brenes *et al.* 2002, Vásquez 2002).

Una de las herramientas que utilizan los programas de mejoramiento genético para la ubicación y disección de genes de interés es el desarrollo de mapas genéticos. Existen 2 tipos de mapa, los mapas de ligamiento molecular, que están formados por marcadores de ADN ubicados en posiciones relativas unos de otros, basándose en ligamientos genéticos, y los mapas físicos, que consisten de fragmentos genómicos clonados ordenados linealmente como ocurren en el cromosoma del organismo considerado. En *S. tuberosum* existe un mapa genético donde han sido ubicados algunos genes dominantes relacionados con la resistencia extrema o de tipo hipersensible de virus como: el PVX, el PVY (*Potato virus Y*) y el PVA (*Potato virus A*), los cuales han sido relacionados con los cromosomas V, IX, XI y XII de papa (Gebhardt *et al.* 1999, Ribaut y Hoisington 1998, Rouppe van der Voort *et al.* 1998, Dear 1997, Young 1996, Meksen *et al.* 1995, Tanksley *et al.* 1992, Ritter *et al.* 1991). En el caso particular de *S. commersonii* Zhu *et al.* (1996) y Valverde (1998) generaron mapas de ligamiento, con marcadores moleculares relacionados con genes que codifican resistencia contra

factores abióticos y algunas enfermedades.

El objetivo del presente trabajo fue identificar y mapear AFLPs relacionados con la resistencia extrema al PVX en *Solanum commersonii*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

El estudio se realizó en 26 plantas F₂, provenientes del cruce entre 2 individuos denominados 78,7 y 2100, ambos heterocigotos y resistentes al virus PVX_{MS} de la papa; que a su vez eran producto del cruce entre 2 progenitores silvestres de *Solanum commersonii*. Tanto la población F₁ como la F₂ fueron producidas por el INTA (Instituto Nacional de Tecnología Agrícola) de Argentina.

Raza viral utilizada para evaluar la resistencia

Para evaluar la resistencia o susceptibilidad de los individuos de la progenie (F₂), estos individuos fueron inoculados con la raza viral PVX_{MS}, la cual fue aislada de plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) de la variedad Xanthi.

Inoculación de las plantas

Hojas de tabaco (*Nicotiana* sp.) infectadas con el PVX fueron homogeneizadas en un buffer fosfato 0,1 M (pH 8,0) en una relación de 1:2 (peso: volumen) (Russo *et al.* 1998). El extracto obtenido fue aplicado a las hojas de los padres y la progenie, ubicadas en la parte media de las plantas, con el uso de un material abrasivo. Las plantas fueron mantenidas en un invernadero libre de insectos y con una temperatura de 22 a 25°C.

ELISA

Para corroborar el fenotipo de los progenitores y establecer el de la F₂ (resistencia o susceptibilidad) 30 días después de la inoculación con el virus se realizó un análisis inmunológico

denominado ELISA doble-sandwich (DAS-ELISA) (CIP 1997, Ausubel *et al.* 1995, Hampton *et al.* 1990, Sánchez y Cambra 1987). La infección se cuantificó utilizando anticuerpo anti PVX conjugado con fosfatasa alcalina de un kit comercial (Enzyme immunoassay for the *in vitro* detection of potato virus X, Boehringer Mannheim, Alemania), el cual una vez agregado al sustrato presentó un producto de reacción coloreado en los casos en que había presencia de virus en la planta.

Con el uso de un espectrofotómetro de 8 canales automático (Titertek Multiscan MC, Flow Laboratory) calibrado a 405 nm y los controles positivo y negativo fue posible cuantificar la presencia del virus en las muestras.

Extracción de ADN

El ADN genómico de las plantas de papa se extrajo mediante el método CTAB modificado por Maroof *et al.* (1984) (citado por Hoisington *et al.* 1994). Este consistió en pulverizar hojas frescas con nitrógeno líquido en un mortero. El macerado se incubó en buffer CTAB durante 60 a 90 min. a 65°C. Luego fue tratado con cloroformo:octanol (24:1 v/v) y el ADN fue precipitado con isopropanol. El ADN fue cuantificado mediante espectrofotometría ultravioleta.

Análisis mediante AFLP

La técnica de AFLP fue realizada según el protocolo "AFLP Started Primer Kit" y "AFLP Analysis System I" proveniente de Gibco BRL (Eggenheim, Alemania) y siguiendo las recomendaciones dadas por Vos *et al.* (1995). Muestras de ADN genómico de 450 ng μl^{-1} fueron digeridas con las enzimas *EcoR* I y *Mse* I (1U de cada una) en un volumen de 12,5 μl durante 3 horas a 37°C. Luego fue necesario incubar la mezcla por 15 min. a 70°C para inactivar las enzimas. Posteriormente, se realizó la ligación de los adaptadores *EcoRI* (5'-AATTGGTACG CAGTCTACC TCGTAGACTGCGTACC-3') y *Mse* I (5'-TACT CAGGACTCATGACGATGAGTCC TGAG-3') en un volumen de 12,5 μl de solución adaptador/

ligador, durante 2 horas a temperatura ambiente. Seguidamente se hizo una dilución 1:10 del producto de la ligación con buffer TE (10 mM Tris-HCl, pH 8,0; 0,1 mM EDTA); de la que se tomó 2,5 μl para preparar 25 μl de la mezcla de pre-amplificación (imprimadores, buffer 10X con Mg, y la *Taq* polimerasa). La pre-amplificación consistió de 20 ciclos de: desnaturalización por 30s a 94°C, hibridación por 60s a 56°C y extensión final por 60s a 72°C. Con el producto de la pre-amplificación se hizo una nueva dilución 1:5 con TE, de la que se tomó 2,5 μl para preparar 10 μl de mezcla para la amplificación selectiva de los fragmentos pre-amplificados; en este paso se usó un par de imprimadores, cada uno con 3 nucleótidos selectivos en el extremo 3'. El programa de PCR para esta etapa fue de: 1 ciclo inicial de desnaturalización por 30s a 94°C, hibridación por 30s a 65°C y extensión por 60s a 72°C; seguido por 12 ciclos en los cuales la temperatura de hibridación disminuyó 0,7°C en cada ciclo. Finalmente se realizó 23 ciclos de desnaturalización por 30s a 94°C, de hibridación por 30s a 56°C y de extensión por 60s a 72°C. Para todas las reacciones de amplificación se utilizó un termociclador "PCR System 9700" (PE Applied Bio System, USA).

Análisis mediante RGA

En el INTA, Argentina se analizó la misma población 2100-78,7 de *S. commersonii* con diferentes RGAs diseñados por Leister *et al.* (1996), formados por la secuencia as1/s1 (Cuadro 1) a la cual se le modificó una base nucleotídica para crear un imprimador más específico. De esta forma se seleccionó las siguientes combinaciones: RGA2 (as1T/s1A), RGA3 (as1C/s1A), RGA 4 (as1G/s1A), RGA6 (as1G/s1C) y RGA7 (as1G/s1G). También fueron seleccionadas 3 diferentes combinaciones de AFLPs (AFLP 11, 16a y 17c) cuya secuencia específica se indica en el cuadro 2.

Electroforesis y visualización

A 10 μl de producto de amplificación se le agregó un volumen igual de loading buffer

Cuadro 1. Secuencias y combinaciones de imprimadores para RGAs.

Imprimador 1	Imprimador 2
s1 5'-GGTGGGGTTGGGAAGACAACG-3'	as1 5'-CAACGCTAGTGGCAATCC-3'
s1A 5'-GGTGGGGTTGGGAAGACAACGA-3'	as1G 5'-CAACGCTAGTGGCAATCCG-3'
s1C 5'-GGTGGGGTTGGGAAGACAACGC-3'	as1A 5'-CAACGCTAGTGGCAATCCA-3'
s1T 5'-GGTGGGGTTGGGAAGACAACGT-3'	as1T 5'-CAACGCTAGTGGCAATCCT-3'
s1G 5'-GGTGGGGTTGGGAAGACAACGG-3'	as1C 5'-CAACGCTAGTGGCAATCCC-3'

(10mM EDTA, 98% formamida, 0,05% azul de bromofenol y 0,05% xylene cyanol). Cada una de las muestras fue desnaturalizada por 3 min. a 90°C y depositada rápidamente en hielo. Se colocó 6 µl de cada muestra en un gel de acrilamida al 5% y urea 7M. Como guía se utilizó un marcador de 25 bp (25 bp DNA Ladder, Promega, USA).

La visualización del gel se realizó mediante tinción con nitrato de plata según las indicaciones del proveedor (Promega, USA) con algunas modificaciones para reducir la coloración de fondo e incrementar la sensibilidad del gel.

Segregantes agrupados (BSA)

Con el objetivo de identificar polimorfismos en el patrón de bandas amplificadas ligadas sólo al gen de resistencia se utilizó el método de segregantes agrupados (BSA, Bulk Segregant Analysis) (Mitchelmore *et al.* 1991). Para esto se utilizó los grupos resultantes de la prueba de ELISA (*i.e.* individuos resistentes e individuos susceptibles). El ADN de los individuos de cada grupo fue mezclado y analizado en forma independiente, con 64 combinaciones de imprimadores ("AFLP Started Primer Kit" y "AFLP Analysis System I" de GIBCO BRL) de GIBCO BRL, las cuales consistieron de *EcoR* I (5'-GACTGCGTACCAATTC-nucleótidos específicos-3') con 8 diferentes grupos

de nucleótidos específicos (E-AAC, E-AAG, E-ACA, E-ACT, E-ACC, E-ACG, E-AGC, E-AGG) y *Mse* I (5'-GATGAGTCCTGAGTAA-nucleótidos específicos-3') con 8 diferentes grupos de nucleótidos específicos (M-CAA, M-CAC, M-CAG, M-CAT, M-CTA, M-CTC, M-CTG, M-CTT).

Análisis de la progenie

Producto del BSA fueron seleccionadas 22 diferentes combinaciones de imprimadores (Cuadro 2), para la evaluación independiente de cada uno de los miembros de la población F₂.

Análisis de datos

El tamaño de los polimorfismos presentes en los AFLPs fue determinado por comparación con un marcador estándar de 25 pb (25 bp DNA Ladder). De acuerdo con esta relación, cada uno de los polimorfismos fue identificado con la primera letra del imprimador (E para *EcoRI* y M para *MseI*), seguido por los nucleótidos selectivos ligados a cada imprimador y finalmente se indicó el tamaño de la banda.

Para el análisis de χ^2 (Chi-cuadrado), la resistencia se evaluó como un marcador segregante simple, el cual segrega en una relación 1:1 (presencia:ausencia de la banda).

Cuadro 2. Secuencias y combinaciones de imprimadores AFLP utilizados para el análisis de la población F_2 proveniente de *S. commersonii*.

Identificación de imprimadores	<i>EcoRI</i> (5' → 3')	<i>MseI</i> (5' → 3')
AFLP3	E ¹ AAC	M ² CAG
AFLP9	E AAG	M CAA
AFLP10	E AAG	M CAC
AFLP15	E AAG	M CTG
AFLP17	E ACA	M CAA
AFLP20	E ACA	M CAT
AFLP21	E ACA	M CTA
AFLP22	E ACA	M CTC
AFLP23	E ACA	M CTG
AFLP26	E ACC	M CAC
AFLP29	E ACC	M CTA
AFLP34	E ACG	M CAC
AFLP35	E ACG	M CAG
AFLP38	E ACG	M CTC
AFLP43	E ACT	M CAG
AFLP44	E ACT	M CAT
AFLP45	E ACT	M CTA
AFLP51	E AGC	M CAG
AFLP52	E AGC	M CAT
AFLP54	E AGC	M CTC
AFLP56	E AGC	M CTT
AFLP59	E AGG	M CAG
INTA11	E ACT	M AGA
INTA16A	E AGC	M AGA
INTA17C	E AGC	M AGA

¹ E, 5'-GACTGCGTACCAATTC-3'

² M, 5'-GATGAGTCCTGAGTAA-3'

Análisis de ligamiento y análisis estadísticos

Cada banda se trató como un locus con un alelo dominante o recesivo según el carácter de resistencia o susceptibilidad al virus estudiado (PVX) donde "0" fue utilizado para indicar la ausencia de bandas, "1" para la presencia de bandas y "2" para las bandas que no amplificaron o fueron inconsistentes.

Con el uso del programa MAPRF6 (Versión 6.2. E. Ritter 2000), se formaron los

grupos de ligamiento, basándose en los fragmentos específicos de cada parental, posteriormente los fragmentos comunes a ambos padres fueron integrados dentro de los grupos de ligamiento como puntos de anclaje (Ritter y Salamini 1996, Ritter *et al.* 1990). De esta forma, se analizó solo las bandas claramente visibles, los casos dudosos fueron excluidos en el procesamiento de los datos.

RESULTADOS

Evaluación de las poblaciones por su resistencia a la infección con PVX_{MS}

La mayoría de las plantas infectadas con el PVX_{MS} no presentaron síntomas visibles a los 30 días de la inoculación; sin embargo, mediante la prueba ELISA se determinó que de una progenie de 26 individuos, 19 no mostraban la presencia del virus (resistentes) y 7 si la mostraban (susceptibles). Así mismo, se comprobó que ambos padres (78,7 y 2100) eran resistentes al PVX_{MS}.

El análisis de la progenie mediante la prueba de X^2 (Chi-cuadrado) mostró que existe un 88,75% de probabilidad de que la segregación se ajuste a la proporción fenotípica 3:1 (3 individuos resistentes: 1 individuo susceptible) ($P \leq 0,05$) para el carácter de resistencia a PVX_{MS}. Estos resultados ponen de manifiesto, el estado heterocigota de ambos padres y la naturaleza monogénica de la resistencia en estudio. Así mismo, una proporción fenotípica 3:1 indica la existencia de 3 clases genotípicas en la progenie: resistente homocigota (RR), resistente heterocigota (Rr) y susceptible homocigota (rr).

Identificación de marcadores polimórficos mediante BSA

La mezcla de ADN de los individuos de la F_2 en 2 grupos, los resistentes y los susceptibles, para el carácter de resistencia al PVX_{MS}, permitió aplicar la estrategia de "análisis de grupos segregantes, BSA" a dichos grupos y así identificar marcadores moleculares ligados al carácter de

resistencia en estudio. Mediante esta técnica se generó perfiles de AFLPs utilizando las 64 combinaciones de imprimadores *EcoRI/MseI*. Cada combinación amplificó de forma reproducible, un promedio de 35 bandas (entre 50 y 500 pb de tamaño). Considerando cada fragmento de AFLP como un locus -sin tomar en cuenta posibles alelismos entre diferentes fragmentos- se analizó aproximadamente 2290 loci mediante el BSA.

De las 64 combinaciones de imprimadores analizadas, 22 mostraron bandas polimórficas entre ambos grupos. Sin embargo, de las 22 combinaciones solo 19 presentaron polimorfismos nítidos y reproducibles. En total se encontró 247 bandas polimórficas, las cuales representan un 10,77% del total de loci analizados. De estas 247 bandas un 6,32% está ligado al carácter de resistencia y un 5,06% al carácter de susceptibilidad, mientras que el resto de las bandas está ligado a ambos grupos.

Posteriormente, para cuantificar el grado de ligamiento entre los marcadores encontrados y el locus de interés, se analizó cada individuo de la F_2 por separado, con el uso de AFLPs. Se observó, que para cada combinación de imprimadores, los patrones de bandas obtenidos en el BSA, tanto para el grupo de individuos resistentes como para el grupo de individuos susceptibles, correspondían con los patrones de bandas que presentaban cada uno de los individuos de la F_2 .

La cantidad de polimorfismos encontrados en cada combinación de imprimadores fue variable, 5 combinaciones presentaron únicamente 1 polimorfismo mientras que las 14 restantes presentaron de 2 a 6 polimorfismos. En total estas 19 combinaciones de imprimadores generaron 45 polimorfismos de interés (Cuadro 3). Al evaluar la participación de los diferentes imprimadores, en forma independiente, en la generación de

polimorfismos, se encontró que hay una alta relación entre la cantidad de éstos y las secuencias de nucleótidos asociadas a: E-ACA, E-AGC y M-CAT. Dichas secuencias participaron en la generación de un total de 33,34, 24,4, y 20% de los polimorfismos obtenidos; respectivamente.

A partir del estudio de toda la progenie se analizó aproximadamente 64200 loci, de los cuales 60200 fueron informativos para el carácter de resistencia.

En la figura 1 se presenta el patrón de bandas polimórficas encontrado con la combinación de imprimadores denominada AFLP23 (Cuadro 2). En la primera columna se encuentra el marcador estándar, utilizado para asignar el peso molecular a los polimorfismos. En la segunda y tercera columnas se encuentran los grupos segregantes generados a partir del BSA, el grupo resistente (R_b) y el susceptible (S_b), respectivamente. En las siguientes columnas se encuentran los individuos de la progenie, denominados como susceptibles (S) y resistentes (R), de acuerdo con los datos obtenidos mediante el ELISA. En el patrón de bandas polimórfico (señalado con una flecha), es posible observar como la banda de referencia está presente únicamente en el grupo de los individuos resistentes y ausente en el grupo de los individuos susceptibles. Sin embargo, también ocurrió la aparición de esta banda en individuos susceptibles y la ausencia en resistentes; sin que esto indicara que la asignación del marcador haya sido errada, lo que ocurre es que disminuye la probabilidad de que dicha banda esté ligada directamente al carácter de interés.

Análisis de ligamiento

Mediante el uso del programa MAPRF6 se generó 4 grupos de ligamiento con un total de 23

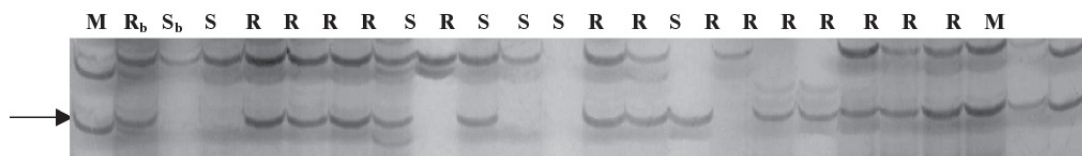


Fig. 1. Patrón de bandas para AFLPs realizado a la progenie 2100-78,7.

Cuadro 3. Características de las combinaciones de los AFLPs y los polimorfismos generados.

Identificación de imprimadores	Identificación para MAPRF6	Secuencia y peso molecular	Identificación de imprimadores	Identificación para MAPRF6	Secuencia y peso molecular
AFLP3	AFLP2	E-AAC+M-CAG _{318,75bp}	AFLP44	AFLP25	E-ACT+M-CAT _{131,25bp}
AFLP10	AFLP3	E-AAG+M-CAC _{365,63bp}	AFLP44	AFLP26	E-ACT+M-CAT _{281,25bp}
AFLP10	AFLP4	E-AAG+M-CAC _{368,75bp}	AFLP51	AFLP27	E-AGC+M-CAG _{190bp}
AFLP10	AFLP5	E-AAG+M-CAC _{371,88bp}	AFLP52	AFLP28	E-AGC+M-CAT _{425bp}
AFLP15	AFLP6	E-AAG+M-CTG _{400bp}	AFLP52	AFLP29	E-AGC+M-CAT _{325bp}
AFLP15	AFLP7	E-AAG+M-CTG _{446,88bp}	AFLP52	AFLP30	E-AGC+M-CAT _{278bp}
AFLP21	AFLP8	E-ACA+M-CTA _{375bp}	AFLP54	AFLP31	E-AGC+M-CTC _{212bp}
AFLP21	AFLP9	E-ACA+M-CTA _{293,75bp}	AFLP56	AFLP32	E-AGC+M-CTT _{350bp}
AFLP38	AFLP10	E-ACG+M-CTC _{273bp}	AFLP56	AFLP33	E-AGC+M-CTT _{300bp}
AFLP45	AFLP11	E-ACT+M-CTA _{337,5bp}	AFLP56	AFLP34	E-AGC+M-CTT _{250bp}
AFLP45	AFLP12	E-ACT+M-CTA _{184,38bp}	AFLP56	AFLP35	E-AGC+M-CTT _{212,5bp}
AFLP59	AFLP13	E-AGG+M-CAG _{275bp}	AFLP56	AFLP36	E-AGC+M-CTT _{150bp}
AFLP59	AFLP14	E-AGG+M-CAG _{340,5bp}	AFLP56	AFLP37	E-AGC+M-CTT _{175bp}
AFLP59	AFLP15	E-AGG+M-CAG _{225bp}	AFLP23	AFLP38	E-ACA+M-CTG _{368,75bp}
AFLP17	AFLP16	E-ACA+M-CAA _{431,25bp}	AFLP23	AFLP39	E-ACA+M-CTG _{306,25bp}
AFLP17	AFLP17	E-ACA+M-CAA _{400bp}	AFLP23	AFLP40	E-ACA+M-CTG _{256bp}
AFLP22	AFLP18	E-ACA+M-CTC _{296,88bp}	AFLP23	AFLP41	E-ACA+M-CTG _{228,13bp}
AFLP22	AFLP19	E-ACA+M-CTC _{171,5bp}	AFLP23	AFLP42	E-ACA+M-CTG _{190,63bp}
AFLP26	AFLP20	E-ACC+M-CAC _{309,25bp}	AFLP20	AFLP43	E-ACA+M-CAT _{368,75bp}
AFLP26	AFLP21	E-ACC+M-CAC _{293,75bp}	AFLP20	AFLP44	E-ACA+M-CAT _{271,75bp}
AFLP29	AFLP22	E-ACC+M-CTA _{400bp}	AFLP20	AFLP45	E-ACA+M-CAT _{273bp}
AFLP43	AFLP23	E-ACT+M-CAG _{198bp}	AFLP20	AFLP46	E-ACA+M-CAT _{225bp}
AFLP43	AFLP24	E-ACT+M-CAG _{196bp}			

marcadores moleculares (Figura 2). Estos marcadores representan el 51,1% de los 45 marcadores polimórficos localizados mediante el estudio del BSA, el 48,8% restante no mostró relación con el locus de resistencia (*Rx*).

En el grupo de ligamiento A, donde los marcadores moleculares se encuentran más cercanos al locus de resistencia, se ubicó 5 marcadores moleculares. Como se puede observar en la figura 2 el alelo de resistencia se encuentra rodeado por

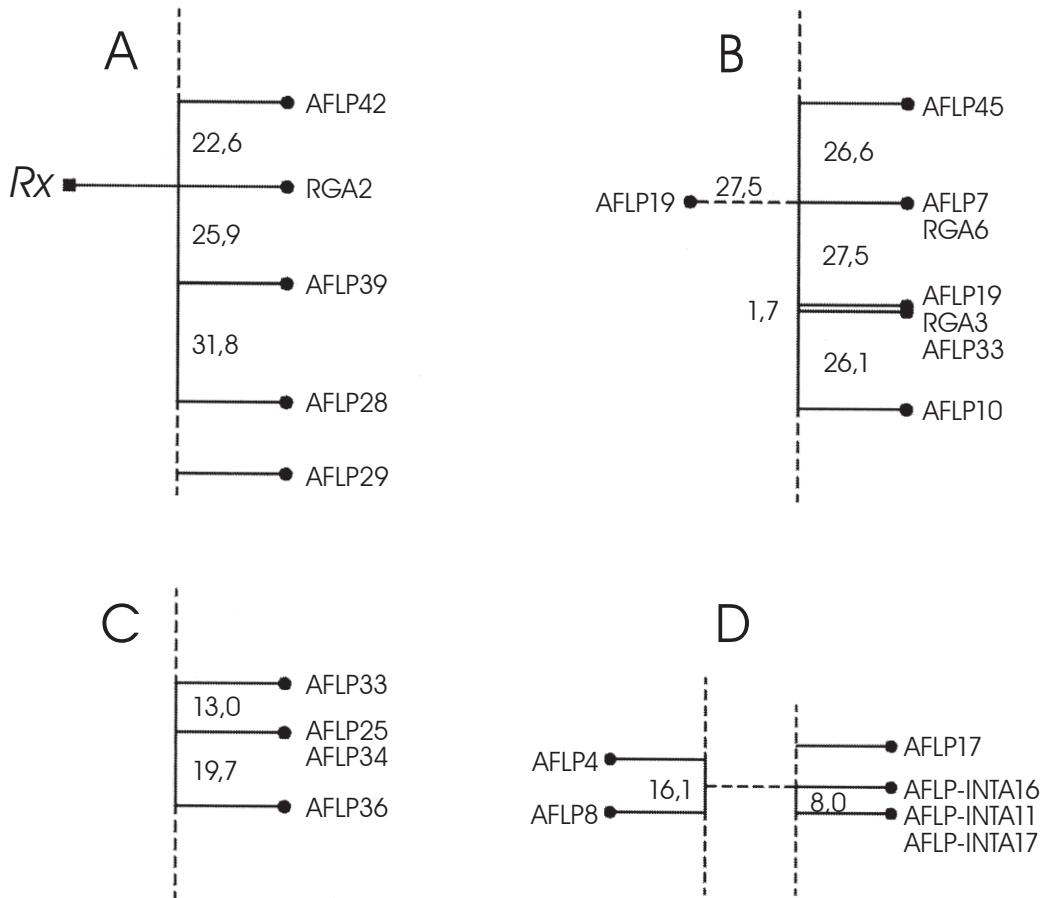


Fig. 2. Grupos de ligamiento para la población de *S. commersonii* 2100- 78,7 generados con el programa MAPFR6. A) Grupo de ligamiento 1 formado por 5 marcadores moleculares localizados en las cercanías del locus *Rx* (resistencia extrema). B) Grupo de ligamiento 2 formado por 8 marcadores moleculares. C) Grupo de ligamiento 3 formado por 4 marcadores moleculares y D) Grupo de ligamiento 4 formado por 6 marcadores moleculares. Las distancias genéticas están dadas en centimorgans (cM).

los marcadores: AFLP42 localizado a 22,6 cM del alelo *Rx*, el AFLP39 a 25,9 cM y el AFLP28 a 31,8 cM; todos estos marcadores se encuentran unidos en fase de acoplamiento al alelo *Rx*. En el mismo grupo, el marcador RGA2 co-segrega con el locus de resistencia en fase de repulsión.

Los grupos de ligamiento B, C y D reúnen 18 marcadores moleculares, de los cuales 12 se encuentran ligados en fase de acoplamiento y 6 se encuentran ligados en fase de repulsión al alelo de resistencia. Las distancias genéticas entre los 18 marcadores varían desde 1,7 hasta 27,5 cM.

DISCUSIÓN

Análisis fenotípico

La clasificación fenotípica de los individuos pertenecientes a la población de *S. commersonii*, en resistentes y susceptibles se facilitó por la disponibilidad de una metodología sencilla, segura y eficiente como es la detección inmunológica, mediante el análisis ELISA. Esta técnica es utilizada como método de diagnóstico de infecciones por diversos patógenos (Theilmann *et al.* 2002,

Oruetxebarria *et al.* 2000, Terrada *et al.* 2000, Davis 1998, Rajamaki *et al.* 1998, Santa Cruz y Baulcombe 1993), en nuestro caso fue utilizada para determinar la presencia o ausencia del PVX en plantas inoculadas. Con esa metodología se identificó las plantas pertenecientes a la progenie en estudio, que presentaban resistencia y susceptibilidad a la infección por la raza PVX_{MS}, que es la más virulenta dentro del grupo de los PVX. Cabe destacar, que esta resistencia se dio en la mayoría de los individuos de la progenie, aún cuando la infección se realizó con gran cantidad de inóculo viral. Esto confirma el potencial de *S. commersonii* como una especie de gran valor tanto por los genes de resistencia al PVX que posee como por otros genes de importancia que ya han sido identificados (Barone *et al.* 2001, Valverde 1998, Zhu *et al.* 1996, Cardi *et al.* 1993).

Segregación de la resistencia al PVX_{MS}

El análisis de segregación se ajustó a una proporción 3:1, lo que indica que la resistencia al PVX_{MS} es controlada por un único gen y que ambos padres son heterocigotas. El confirmar la naturaleza monogénica de la resistencia extrema a una de las razas más virulentas que existen, la PVX_{MS}, hace sumamente atractivo el hallazgo de marcadores moleculares que estén estrechamente ligados a la resistencia a este virus, ya que las posibilidades de transferir esta resistencia a las especies cultivadas de papa son mayores que cuando se trata de una herencia poligénica.

Los individuos segregantes pueden ser clasificados en 3 clases genotípicas: heterocigota (Rr), homocigota resistente (RR) y homocigota susceptible (rr). De esta forma, los grupos segregantes se formaron con el ADN de individuos heterocigotas y homocigotas para el grupo resistente e individuos homocigotas para el grupo susceptible. Esta característica de homocigocidad en ambos grupos, facilitó encontrar diferencias entre los grupos segregantes.

Al ser los AFLP marcadores de tipo dominante, en un gel de acrilamida con tinción de nitrato de plata no es posible visualizar diferencias entre los homocigotos dominantes y los

heterocigotos. Sin embargo, en estudios con otros métodos de evaluación, como los realizados con el GeneScan[®] 2.1 y evaluados con el Genotyper[®], los AFLPs se comportan como marcadores codominantes y no hay problema en identificar los homocigotos dominantes de los heterocigotos (Saal y Wricke 2002, Valverde 1998).

Análisis de grupos de segregantes (BSA) con AFLPs

El porcentaje de polimorfismos localizados en los 2 grupos (resistente y susceptible) fue de 10,77%, para un total de 2290 locus analizados. Según Saal y Wricke (2002) en promedio, el porcentaje de bandas, encontradas mediante los marcadores AFLP, es bajo en comparación con los polimorfismos que pueden ser detectados mediante técnicas como RFLPs o SSRs. Sin embargo, en la literatura se reporta que en una población de centeno el porcentaje de polimorfismos fue de 12,5% (Saal y Wricke 2002), en una población de cebada se encontró un 11,3% (Becker *et al.* 1995) y un 10,1% en una población de soya (Keim *et al.* 1997). Desde luego que también hay informes donde los loci polimórficos llegaron a alcanzar el 20,3%, esto sucedió en una población grande de maíz (Vuylsteke *et al.* 1999), lo que confirma la importancia de utilizar poblaciones de gran tamaño que incrementen y aseguren la presencia de bandas relacionadas al carácter de interés. Otro factor que en nuestro caso influyó directamente sobre la cantidad de polimorfismos encontrados, es que la población segregante proviene de 2 individuos del mismo género y especie, lo cual disminuye la probabilidad de encontrar una variación alta entre los distintos individuos, como puede suceder con segregantes provenientes de 2 especies diferentes.

Con respecto al tipo de imprimador utilizado para la obtención de los polimorfismos, es claro que hay algunas secuencias específicas que generan una mayor cantidad, tal es el caso de E-ACA, E-AGC y M-CAT, las cuales forman parte de la mayoría de los polimorfismos encontrados, esta información es de vital importancia para el diseño de imprimadores que puedan ser

utilizados en la evaluación de caracteres asociados a esta especie.

En la búsqueda de marcadores AFLP se empleó el método de tinción con plata, este permitió visualizar una gran cantidad de fragmentos amplificados, correspondientes a las combinaciones de imprimadores: *EcoRI/MseI*, *EcoRI/EcoRI* y *MseI/MseI*. Este método se seleccionó porque evita el trabajar con radioactividad (marcación radioactiva). Otra ventaja de ésta técnica es que permite rescatar bandas directamente del gel. Una banda de interés, se puede aislar y posteriormente re-amplificar con la combinación de imprimadores que la originó. La banda también puede ser secuenciada, obteniéndose la información necesaria para el diseño de oligonucleótidos específicos, que permitan la amplificación directa de la región cromosómica involucrada (Meksem *et al.* 1995).

En éste estudio, los resultados con el método de AFLP fueron idénticos en las 2 repeticiones realizadas, esto indica la gran reproducibilidad y confiabilidad del método; lo cual también ha sido demostrado en otros trabajos (Saal y Wricke 2002, Savelkoul *et al.* 1999, Eujayl *et al.* 1998, Brigneti *et al.* 1997, Folkertsma *et al.* 1996). Asimismo, tiene la ventaja de que los productos de amplificación ya analizados pueden ser conservados en frío durante varios meses y luego pueden ser nuevamente tratados mediante electroforesis y visualizados con tinción con plata, conservándose el mismo patrón de bandas; esto confirma la estabilidad de las reacciones con esta técnica (Vos *et al.* 1995). Otra ventaja de esta técnica es el alto número de loci analizados por reacción (de 40 a 100 loci); de ésta manera con las 64 combinaciones de imprimadores, se analizó un mínimo de 64200 loci.

AFLPs y RGAs ligados al gen de resistencia extrema a PVX Rx_{cmm}

Mediante este estudio se logró la localización de AFLPs, relacionados al virus X de la papa, que constituyen un paso importante en los estudios relacionados con este patógeno y que permiten la creación de un mapa genético

de ésta especie, que faciliten el estudio tanto de factores bióticos como abióticos. También sería posible usar estos marcadores para incrementar la densidad del mapa genético de *S. tuberosum* y de *S. commersonii*.

Con el programa de mapeo MAPRF6, se logró crear 4 grupos de ligamiento independientes, que representan 4 de los 12 cromosomas que poseen las especies diploides de *Solanum*. Para ampliar el número de grupos de ligamiento así como la cantidad de marcadores en cada grupo, es necesario trabajar con poblaciones de mayor tamaño (Ritter y Salamni 1996). Grupos de ligamiento densos permiten, además, poder asignar estos grupos al cromosoma correspondiente, tal y como se ha hecho para los genomas de papa y tomate (Tanksley *et al.* 1992).

Cabe recalcar que mediante la utilización del programa MAPRF6 se logró ubicar un RGA que co-segrega con el locus *Rx* a una distancia de 0 cM. Esto indica que la secuencia específica de este marcador podría generar un segmento de nucleótidos idéntico al del carácter buscado. Un hallazgo de esta magnitud conduciría a la generación de fragmentos específicos, clonados a partir de este marcador, que posteriormente podrían ser utilizados para generar plantas genéticamente modificadas para la resistencia al PVX.

En este mismo grupo de ligamiento en el cual se encuentra el RGA, los marcadores restantes se localizaron a distancias superiores a los 22,6 cM. Si bien es cierto que las distancias menores de 20 cM entre marcadores son muy deseables, también es cierto que aquellas superiores son necesarias para generar mapas de alta densidad. Para lograr este objetivo, se hace necesaria la utilización de la mayoría de los marcadores localizados en los diversos estudios, para así tratar de saturar la densidad y completar hasta donde sea posible los mapas existentes (Gebhardt *et al.* 1999, Eujayl *et al.* 1998, Bendahmane *et al.* 1997, Mohan *et al.* 1997, Meksem *et al.* 1995, Tanksley *et al.* 1992).

De los 23 marcadores ubicados en los grupos de ligamiento mediante el programa MAPRF6, se encontró 16 ligados en acoplamiento (el loci está ligado a ambos padres o sea porta

ambos alelos dominantes o recesivos para los 2 loci) y 7 ligados en repulsión (el loci solo está ligado a uno de los 2 padres o sea porta un alelo dominante y uno recesivo con el set complementario de alelos en el otro cromosoma) al alelo de resistencia. En trabajos realizados por Davis (1998) y De Jong *et al.* (1997), los únicos loci tomados en cuenta son los unidos en acoplamiento al locus *Rx* ya que la característica buscada segrega a partir de ambos padres.

La técnica de AFLP se ha reportado en gran cantidad de estudios como una técnica fácil y reproducible, además de que permite detectar un gran número de loci en un solo estudio. La utilización de los marcadores AFLP en este estudio mostró ser una herramienta que aumentó tanto la rapidez como la precisión del trabajo. Se determinó que es posible detectar hasta 2000 fragmentos AFLP en 1 ó 2 días, lo cual incrementa la localización de bandas informativas en cualquier tipo de estudio de esta naturaleza.

Al igual que el mapa de *S. tuberosum*, que es uno de los más densos, con alrededor de 1400 marcadores en solo 684 cM (Roupe van der Voort 1998, Tanksley *et al.* 1992), se espera que con la creación y crecimiento de los mapas en otras especies de importancia como *S. commersonii* sea posible, en un futuro no muy lejano, poder relacionar los genes de interés con al menos un marcador molecular en el mapa. Dicha información sería de gran utilidad en los programas de mejoramiento asistido por marcadores (MAS) para así generar especies con características superiores a las que poseemos en este momento.

CONCLUSIONES

1. El análisis de ELISA permitió la separación de los individuos en 2 grupos contrastantes para el carácter de interés. Esta técnica demostró a la vez, una gran confiabilidad por su repetitibilidad en las diferentes pruebas, minimizando errores a la hora de asignar el fenotipo a cada uno de los individuos de la progenie.

2. El BSA es una técnica que facilita la identificación de marcadores moleculares relacionados con la característica de interés, con lo cual los procesos de fitomejoramiento se pueden realizar en un menor tiempo.
3. Los marcadores moleculares AFLP presentaron una gran sensibilidad, confiabilidad y fácil manejo.
4. La presencia de genes de resistencia al PVX en *S. commersonii* se pudo corroborar cuando la planta logró contrarrestar el ataque de la raza MS del PVX, considerada como una de las más virulentas.
5. Tanto el RGA2 como el AFLP42 y el AFPL39 son marcadores sumamente informativos por encontrarse en las cercanías del locus de resistencia extrema (*Rx*) al PVX.
6. La utilización de la selección asistida por marcadores (MAS) para localizar caracteres de resistencia, es un elemento que podría acelerar la introgresión de genes de resistencia en variedades de papa, evitando los largos procesos de selección que conlleva el mejoramiento convencional.

AGRADECIMIENTO

Este trabajo fue financiado por la Comisión Europea en el marco del proyecto INCO-PL ICA4-CT-2000-30008. "Resistance wild potato as a source for novel genes mediating resistance against fungal, viral and nematode diseases". También se da un especial agradecimiento al Dr. Enrique Ritter por su ayuda en el manejo del programa MAPFR6.

LITERATURA CITADA

AUSUBEL F., BRENT R., KINGSTON R., MOORE D., SEIDMAN J.G., SMITH J., STRUHL K. 1995.

- Current protocols in molecular biology. Vol II. John Wiley and Sons, Inc., USA. p. 11.0.3-11.2.21.
- BARONE A., SEBASTIANO A., CARPUTO D., DELLA ROCCA F., FRUSCIANTE L. 2001. Molecular marker-assisted introgression of the wild *Solanum comersonii* genome into the cultivated *S. tuberosum* gene pool. *Theor. Appl. Genet.* 102: 900-907.
- BECKER J., VOS P., KUIPER M., SALAMINI F., HEUN M. 1995. Combined mapping of AFLP and RFLP markers in barley. *Mol. Gen. Genet.* 249: 65-73.
- BENDAHMANE A., KANYUKA K., BAULCOMBE D. 1999. The *Rx* gene from potato controls separate virus resistance and cell death responses. *Plant Cell* 11: 781-791.
- BENDAHMANE A., KANYUKA K., BAULCOMBE D.C. 1997. High-resolution genetical and physical mapping of the *Rx* gene for extreme resistance to potato virus X in tetraploid potato. *Theor. Appl. Genet.* 95: 153-162.
- BRENES A., RIVERA C., VASQUEZ V. 2002. Principales enfermedades y plagas de la papa en Costa Rica. San José, Costa Rica. EUNED. 120 p.
- BRIGNETI G., GARCIA-MAS J., BAULCOMBE D.C. 1997. Molecular mapping of the potato virus Y resistance gene *Ry_{sto}* in potato. *Theor. Appl. Genet.* 94: 198-203.
- CARDIT., IANNAMICO V., D'AMBROSIO F., FILIPPONE E., LURQUIN P. 1993. *In vitro* regeneration and cytological characterization of shoots from leaf explants of three accessions of *Solanum comersonii*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 34: 107-114.
- CIP. 1997. Características generales de los virus y la importancia de las enfermedades que causan. Barrera C. (ed.). Manual de Capacitación. Lima, Perú. Fasc. 3.1: 1-8.
- CIP. 1997. Técnicas en virología de plantas. Salazar L.F. y Jayasinghe U. (eds.). Manual de Capacitación. Lima, Perú. s.p.
- DAVIS J. 1998. Identification and development of PCR-based markers linked to Eastern Filbert Blight resistance in hazelnut. Thesis Master of Science. Oregon State University, USA. 53 p.
- DEAR P. 1997. Genome mapping. A practical approach. Oxford University Press, USA. 351 p.
- DE JONG W., FORSYTH A., LEISTER D., GEBHARDT C., BAULCOMBE D.C. 1997. A potato hypersensitive resistance gene against virus X maps to a resistance gene cluster on chromosome 5. *Theor. Appl. Genet.* 95: 246-252.
- DEWAL G., VON STACKELBERG M., VON BRETHORST S. 2000. Methods and application of molecular markers in plant breeding. Universidad de Hannover, Alemania. 38 p.
- DURRANT W., ROWLAND O., PIEDRAS P., HAMMOND-KOSACK K., JONES J. 2000. cDNA-AFLP reveals a striking overlap in race-specific resistance and wound response gene expression profiles. *Plant Cell* 12: 963-977.
- ESTRADA N. 2000. La biodiversidad en el mejoramiento genético de la papa. Ed. CIP, IPGRI, PRACIPA, COSUDE, CID, IBTA, PROINPA. Bolivia. 372 p.
- EUIJAYL I., BAUM M., POWELL W., ERSKINE W., PEHU E. 1998. A genetic linkage map of lentil (*Lens* sp.) based on RAPD and AFLP markers using recombinant inbred lines. *Theor. Appl. Genet.* 97: 83-89.
- FAO. 1995. La papa en la década de 1990. Situación y perspectivas de la economía de la papa a nivel mundial. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, Italia. 50 p.
- FOLKERTSMA R., ROUPPE VAN DER VOORT J., DE GROOT K., ZANDVOORT P., SCHOTS A., GOMMERS F., HELDER J., BAKKER J. 1996. Gene pool similarities of potato cyst nematode populations assessed by AFLP analysis. *Molecular Plant Microbe Interactions* 9(1): 47-54.
- FORAPANI S., CARBONI A., CASTELLANI E., MANDOLINO G., RANALLI P. 1999. RAPD markers for potato germplasm characterization. *J. Genet. & Breed.* 53: 143-147.
- GEBHARDT C., SCHAFFER-PREGL R., OBERHAGE-MANN P., CHEN X., CHATOT-BALANDRAS C., RITTER E., CONCILIO L., BONNEL E., HESSELBACH J., SALAMINI F. 1999. Function maps of potato. EBPB: Phytosfere Proceedings 1999: sv.
- HAMPTON R., BALL E., DE BOER S. 1990. Serological methods for detection and identification of viral and bacterial plant pathogens. A laboratory manual. American Phytopathological Society, USA. p. 179-196.
- HAWKES J.G. 1991. The centers of plant genetic diversity in Latin America. *The Latin America Perspectives* 7(1 y 2): 7-9.
- HOISINGTON D., KHAIRALLAH M., GONZALEZ DE LEON L. 1994. Laboratory Protocols: CIMMYT

- Applied Molecular Genetics Laboratory. 2 ed. Ed. México, D. F.: CIMMYT. 50 p.
- KARP A., KRESOVICH S., BHAT K.V., AYAD W.G., HODGKIN T. 1997. Molecular tools in plant genetic resources conservation: a guide to the technologies. International Plant Genetic Resources Institute. USA. 47 p.
- 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.
- KEIM P., SHCUPP J.M., TRAVIS S.E., CLAYTON K., ZHU T., SHI L. 1997. A high-density soybean genetic map based on AFLP markers. *Crop Sci.* 37: 537-543.
- LEISTER D., KURTH J., LAURIE D., YANO M., SASAKI T., DEVOS K., GRANER A., SCHULZE-LEFERT P. 1996. Rapid reorganization of resistance gene homologues in cereal genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 370-375.
- MEKSEM K., LEISTER D., PELEMAN J., ZABEAU M., SALAMINI F., GEBHARDT C. 1995. A high-resolution map of the vicinity of the R1 locus on chromosome V of potato based on RFLP and AFLP markers. *Mol. Gen. Genet.* 249: 74-81.
- MICHELMORE R., PARAN I., KESSELI V. 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.
- MOHAN M., NAIR S., BHAGWAT A., KRISHNA T.G., YANO M., BHATIA C.R., SASAKI T. 1997. Genome mapping, molecular markers and marker-assisted selection in crop plants. *Molecular Breeding* 3: 87-103.
- ORUETXEBARRIA I., KEKARAINEN T., SPETZ C., VALKONEN J. 2000. Molecular characterization of Potato virus V genomes from Europe indicates limited spatiotemporal strain differentiation. *Phytopathology* 90(4): 437-444.
- QUERCI M., BAULCOMBE D.C., GOLDBACH R.W., SALAZAR L.F. 1995. Analysis of the resistance-breaking determinants of potato virus X (PVX) strain HB on different potato genotypes expressing extreme resistance to PVX. *Phytopathology* 85(9): 1003-1010.
- RAJAMAKI M., MERITZ A., RABENSTEIN F., ANDREJEVA J., PAULIN L., TEKARAINEN T., KREUZE J.F., FORSTER R.L.S., VALKONEN J. 1998. Biological, serological and molecular differences among isolates of potato A potyvirus. *Phytopathology* 88(4): 311-321.
- RAJESH P.N., TEKEOGLU M., GUPTA V.S., RANJEKAR P.K., MUEHLBAUER F.J. 2002. Molecular mapping and characterization of an RGA locus RGAptokin1-2₁₇₁ in chickpea. *Euphytica* 128: 427-433.
- RIBAUT J., HOISINGTON D. 1998. Marker-assisted selection: new tools and strategies. *Science* 3(6): 236-239.
- 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.
- RITTER E., GEBHARDT C., SALAMINI F. 1990. Estimation of recombination frequencies and construction of RFLP linkage maps in plants from crosses between heterozygous parents. *Genetics* 224: 645-654.
- RITTER E., SALAMINI F. 1996. The calculation of recombination frequencies in crosses of allogamous plant species with application to linkage mapping. *Genet. Res.* 67: 55-65.
- ROUPPE VAN DER VOORT J.N.A.M., VAN ECK H.J., DRAAISTRA J., VAN ZANDVOORT P.M., JACOBSEN E., BAKKER J. 1998. An online catalogue of AFLP markers covering the potato genome. *Molecular Breeding* 4: 73-77.
- RUSSO P., SLACK S.A. 1998. Tissue culture methods for the screening and analysis of putative virus-resistant transgenic potato plants. *Phytopathology* 88(5): 437-441.
- SAAL B., WRICKE G. 2002. Clustering of amplified fragment length polymorphism markers in a linkage map of rye. *Plant Breeding* 121: 117-123.
- SALAS A., SPOONER D., HUAMAN Z., TORRES R., HOEKSTRA R., SCHULER K., HIJMANS R. 2001. Taxonomy and new collections of wild potato species in Central and Southern Peru in 1999. *Amer. J. of Potato Res.* 78: 197-207.
- SÁNCHEZ-VISCAINO J.M., CAMBRA M. 1987. Técnicas inmunoenzimáticas ELISA en patología animal y vegetal. Office Internacional des Epizooties. Francia. p. 1-57.
- SANTA CRUZ B., BAULCOMBE D. 1993. Molecular analysis of potato virus X isolates in relation to the potato hypersensitivity gene *Nx*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 6(6): 707-714.

- SAVELKOUL P.H.M., AARTS H.J.M., DE HAAS J., DIJKSHOORN L., DUIM B., OTSEN M., RADEMAKER J.L.W., SCHOULS L., LENSTRA J.A. 1999. Amplified-fragment length polymorphism analysis: the state of an art. *Journal of Clinical Microbiology* 37(10): 3083-3091.
- SMITH B. 1995. The origins of agriculture in the Americas. *Evolutionary Anthropology* 1995: 174-184.
- TANKSLEY S.D., GANAL M.W., PRINCE J.P., DE VICENTE M.C., BONIERBALE M.V., BROUN P., FULTON T.M., GIOVANNONI J., GRANDILLO S., MARTIN G.B., MESSEGUER R., MILLER J.C., MILLER L., PATERSON A.H., PINEDA O., RODER M.S., WING R.A., WU W., YOUNG N.D. 1992. High density molecular linkage maps of the tomato and potato genomes. *Genetics* 132: 1141-1160.
- TERRADA E., KERSCHBAUMER R., GIUNTA G., GALEFFI P., HIMMLER G., CAMBRA M. 2000. Fully "recombinant enzyme-linked immunosorbent assays" using genetically engineered single-chain antibody fusion proteins for detection of *Citrus tristeza* virus. *Phytopathology* 90(12): 1337-1344.
- THEILMANN J., MOZAFARI J., READE R., WU Z., XIE W., JESPERSON G., BERNARDY M., EASTWELL K., ROCHON D. 2002. Partial nucleotide sequence and genome organization of a canadian isolate of *Little cherry virus* and development of an enzyme-linked immunosorbent assay-based diagnostic test. *Phytopathology* 92(1): 87-98.
- VALVERDE R. 1998. Molecular genetics of frost hardiness and cold acclimation in *Solanum* species. Thesis Ph.D. Oregon State University, USA. 122 p.
- VASQUEZ V. 2002. Dinámica de los virus en el cultivo de la papa (*Solanum tuberosum*) en la zona norte de Cartago, efectos en la producción de los virus PVX y PVY e identificación de aislamientos de PVY. Tesis Mag. Sc. San José, C.R., Universidad de Costa Rica. 97 p.
- 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 Acid Research* 23(21): 4407-4414.
- VUYLSTEKE M., MANK R., ANTOISE R., BASTIAANS E., SENIOR M.L., STUBER C.W., MELCHINGER A.E., LUBBERSTEDT X.C., XIA P., STAM P., ZABEAU M., KUIPER M. 1999. Two high-density AFLP linkage maps of *Zea mays* L.: analysis of distribution of AFLP markers. *Theor. Appl. Genet.* 99: 921-935.
- WILLIAMS J., KUBELIK A., LIVAK K., RAFALSKI A., TINGEY S. 1990. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* 18(22): 6531-6535.
- YOUNG N.D. 1996. QTL mapping and quantitative disease resistance in plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* 34: 479-501.
- ZAITLIN M., PALUKAITIS P. 2000. Advances in understanding plant viruses and virus diseases. *Annu. Rev. Phytopathol.* 38: 117-143.
- ZHU B., CHEN T.H.H., LI P.H. 1996. Analysis of late blight disease resistance and freezing tolerance in transgenic potato plants expressing sense and antisense genes for osmotin-like protein. *Planta* 198: 70-77.