

EVALUACIÓN MOLECULAR DE LA RESISTENCIA DE VARIEDADES DE PAPA A *Phytophthora infestans* EN REPÚBLICA DOMINICANA

Atharva V. Rosa¹, Iris Pérez-Almeida², Julio Mejía¹, Guarina Delmonte¹ e Ineko Hodai¹

RESUMEN

La identificación de genes de interés agronómico se facilita con el uso de marcadores moleculares ligados a ellos que permiten seleccionar genotipos con rasgos de interés. Con el objetivo de identificar materiales de papa (*Solanum tuberosum*) con genes de resistencia al tizón tardío (*Phytophthora infestans*) fueron utilizadas cinco combinaciones de cebadores de marcadores moleculares SCAR (*sequence characterized amplified region*). Se tomaron muestras de tubérculos de doce fincas del municipio Constanza, tres de la provincia de San José de Ocoa y siete de diferentes genotipos disponibles en tiendas comerciales. A partir de esos tubérculos se establecieron 116 plántulas *in vitro* y se tomaron muestras de hojas para extracción de ADN. Éste fue amplificado por PCR y visualizado mediante electroforesis en geles de agarosa al 2 %. Los geles fueron digitalizados y posteriormente analizados por presencia y ausencia de amplicones, así como por comparación del tamaño de las bandas observado versus esperado. Se presentaron fragmentos polimórficos y monomórficos para el total de cultivares en cada marcador estudiado, los cuales correspondieron a alelos relacionados a la resistencia a *P. infestans*. El marcador GP179 presentó un fragmento monomórfico de 570 pb. En PrP1 los alelos resultantes guardaron algo de relación con las variedades estudiadas. R1, fragmento característico del gen R1 de resistencia, se presentó sólo en el CPC336 (control positivo), mientras que CosA estuvo presente en una muestra de la variedad Granola y en el CPC336. Es el primer informe del uso de este tipo de marcadores para la detección de resistencia a enfermedades que se señala en República Dominicana.

Palabras clave adicionales: Marcadores moleculares, mejora genética, PCR, *Solanum tuberosum*, tizón tardío

ABSTRACT

Molecular assessment of potato varieties resistance to *Phytophthora infestans* in the Dominican Republic

The identification of agronomical interesting genes is facilitated by the use of molecular markers linked to them that allow the selection of genotypes with the traits of interest. With the aim to identify potato materials (*Solanum tuberosum*) with late blight (*Phytophthora infestans*) resistance genes, five combinations of SCAR (*sequence characterized amplified region*) molecular marker primers were used. Tuber samples were collected from 12 farms of Constanza county, 3 of San José de Ocoa and seven varieties available at commercial stores. From these tubers, 116 *in vitro* plantlets were established, taking leave samples for DNA isolation. The DNA was amplified by PCR and visualized using electrophoresis on 2% agarose gels. The gels were digitalized and later analyzed by the presence and absence of amplicons, as well as comparing the observed versus the expected size of the bands. Polymorphic and monomorphic fragments were obtained for the total of cultivars in each studied marker; which corresponded to alleles related to the resistance to *P. infestans*. Marker GP179 yielded a monomorphic fragment of 570 bp. For PrP1 the resulting alleles showed some relationship with the studied varieties. R1, a characteristic fragment of the R1 resistance gene, was found only in the CPC336 (positive check), whereas CosA was present in a Granola variety sample and in CPC336. This is the first report of using this type of markers for detection of disease resistance that is indicated in the Dominican Republic.

Additional key words: Genetic improvement, late blight, molecular markers, PCR, *Solanum tuberosum*

INTRODUCCIÓN

La papa pertenece a las solanáceas, una gran familia de plantas con más de 3000 especies que

incluye diversos cultivos de importancia económica; el cultivo ocupa el tercer lugar de importancia en la alimentación humana a nivel mundial (Visser, 2009; Nelson et al., 2010).

Recibido: Agosto 9, 2018

Aceptado: Febrero 18, 2019

¹ Instituto de Innovación en Biotecnología e Industria (IIBI), P.O. Box 329-2, Santo Domingo. Rep. Dominicana. e-mail: atharva23@hotmail.com; mbreaaj@yahoo.es; guarinad@hotmail.com; inekohodai@hotmail.com

² Facultad de Ingenierías, Universidad Ecotec, km. 13,5 vía Samborondón, Guayas, Ecuador. e-mail: iperez@ecotec.edu.ec (autor de correspondencia)

En República Dominicana, la papa (*Solanum tuberosum* L.) tiene gran impacto en las economías rurales (mayormente en el municipio Constanza y la provincia San José de Ocoa), y constituye un alimento que contribuye a mejorar los niveles nutricionales de la población, aporta proteínas de alta calidad biológica, buen balance y proporción de aminoácidos esenciales y una adecuada relación entre calorías de origen proteico a calorías totales (Rodríguez y Santos, 2002).

Para el año 2017, la producción nacional alcanzó 185.542 Mg y se importaron 29.106 Mg de este tubérculo principalmente en forma de semillas, papas frescas, cocidas, preparadas y congeladas. Dichas importaciones se explican por la poca disponibilidad de genotipos comerciales en los campos de siembra, pues en el país apenas se cultivan tres variedades de papa (Maranca, Granola y Atlántica) debido en parte a la baja adaptabilidad del cultivo y a las enfermedades. Los costos de producción de la papa corresponden a gastos en plaguicidas en un 26 %, lo que ocasiona daños por contaminación al ambiente y toxicidad a los seres humanos (MAPRE, 2018).

Las especies del género *Solanum* están ampliamente distribuidas en América. Alrededor de 190 especies silvestres de tubérculos se pueden cruzar directamente con la papa común conformando un recurso útil para la creación de nuevos cultivares comestibles ya que poseen una amplia gama de resistencia a diversos patógenos (Visser et al., 2009).

Las plagas y enfermedades son los principales problemas para el cultivo de papa en todo el mundo, sobre todo en las parcelas de los agricultores de escasos recursos, en los países menos desarrollados, donde la certificación de cultivos y la protección química generalmente no son accesibles, así como también en la agricultura orgánica en los países industrializados. Se estima que las plagas y enfermedades del cultivo de papa causan 30 % de pérdidas antes de la cosecha y 20 % en postcosecha en los países en desarrollo, en comparación con 5 y 10 % en países desarrollados (Gabriel et al., 2016).

La biología molecular ofrece nuevas herramientas para estudiar, manipular o modificar procesos metabólicos, incluyendo la respuesta tales como la defensa de las plantas de papa frente a patógenos e identificación de éstos (Bonierbale

et al., 2004; Álvarez et al., 2017). La mayoría de los rasgos importantes en los cultivos tales como producción, calidad y resistencia a enfermedades son controlados por genes que pueden asociarse a marcadores moleculares (Mosquera et al., 2008; Ballesteros et al., 2010). En los últimos años, gracias al desarrollo de las técnicas moleculares se ha ampliado el conocimiento de la resistencia genética en papa (Gebhardt et al., 2004). Con la información aportada a partir de tales estudios se han podido generar mapas funcionales que contienen las regiones cromosómicas para estos loci (Mosquera et al., 2008).

El cultivo de la papa es afectado por varios patógenos, incluyendo virus, bacterias, nematodos, hongos, destacando el oomiceto *Phytophthora infestans*, agente causal del tizón tardío, la enfermedad más severa que se ha registrado en el mundo. El valor de las pérdidas de la producción global anual y los costos de protección del cultivo se estiman en 5 billones de dólares (Mosquera et al., 2008), permaneciendo como una amenaza constante a la seguridad alimentaria de los países (Haverkort y Verhagen, 2008; Fisher et al., 2012).

Para el control del tizón tardío los agricultores utilizan agroquímicos aun desconociendo su modo de acción. La constante emergencia de patovares resistentes posiblemente resulta de la alta tasa de mutaciones de este patógeno (Randall et al., 2014). En el mejoramiento para resistencia se ha investigado la eficacia de la acumulación de genes R en cultivares deseables (Tan et al., 2010). Sin embargo, los genes R a ser acumulados deben ser seleccionados cuidadosamente basados en el conocimiento de las variaciones en las poblaciones del patógeno (Vleeshouwers et al., 2011). Se han identificado varios genes R efectivos contra patovares de *P. infestans* (Rodewald y Trognitz, 2013). Con la identificación de genes de virulencia codificando por efectores RXLR, los mejoradores han descubierto la manera en que el patógeno evade la detección (Vleeshouwers et al., 2011), información crítica para el desarrollo de estrategias de mejoramiento y durabilidad de los genes R. La variabilidad genética de las poblaciones de *P. infestans* hace que este patógeno sea de difícil control, favorecido por la creciente globalización del comercio y los cambios climáticos (Bartfort, 2013). Parece poco

probable que la resistencia genética por sí sola pueda controlar la enfermedad causada por *P. infestans*, por tanto, simultáneamente se debe recurrir al diseño racional de fungicidas con blancos objetivos identificados mediante un conocimiento profundo de la biología del patógeno. Otras medidas incluyen el control cultural (densidad que favorezca la aireación, manejo de semilla certificada y riego controlado).

Los centros de investigación y de mejoramiento de cultivos han introducido en sus rutinas la selección asistida por marcadores (Mosquera et al., 2008). La selección asistida por marcadores MAS (del inglés *marker-assisted selection*) ofrece numerosas ventajas, con un enfoque que permite hacer mucho más eficiente las estrategias de selección en los programas de mejora de los cultivos. Los marcadores moleculares se han convertido en poderosas herramientas para hacer posible la determinación de las características genéticas de las plantas y seleccionar por el genotipo, en lugar del fenotipo (Arens et al., 2010; Foolad y Panthee, 2012).

Se han utilizado marcadores SCAR (del inglés, *sequence characterized amplified region*) o regiones amplificadas caracterizadas y secuenciadas, para evaluar asociaciones con la resistencia al patógeno en papas diploides y tetraploides. Ballesteros et al. (2010) evaluaron el grupo *S. phureja* que tiene notables características culinarias y nutricionales, e igualmente ha sido identificado como una fuente de resistencia a la gota o tizón tardío, lo cual sitúa a este grupo en una posición de interés como recurso genético con fines de mejoramiento. Ballesteros et al. (2010) caracterizaron genotípicamente 88 accesiones de *S. phureja* con marcadores moleculares tipo SCAR, el gen R1 de resistencia a *P. infestans*, el gen candidato StAOS2 y un marcador tipo CAPS ligado a un loci para resistencia a *P. infestans* en *Solanum tuberosum*.

Por su parte, Juyó et al. (2011) evaluaron el polimorfismo de dichos materiales y si los alelos polimórficos permitían diferenciar genotipos resistentes de susceptibles, y compararon el tamaño de los fragmentos obtenidos con los esperados asociados con resistencia de acuerdo a informes previos. El análisis se realizó considerando los fragmentos CosA210 y 250, R11400 y 1800, BA47f2500, GP179570 y Prp1300, 600 y 900. Este estudio mostró que hay

repuesta diferencial a los marcadores entre las subsp. *tuberosum* y subsp. *andigena*.

Otro estudio molecular fue realizado por investigadores del laboratorio de Biología Molecular y Bioinformática de la Fundación PROINPA de Bolivia (Gabriel et al., 2016), asociando marcadores moleculares con la resistencia a enfermedades, caracteres morfológicos y agronómicos en familias diploides de papa. Caracterizaron quince familias de papa (824 genotipos) provenientes de cruza inter-específicas entre especies de *Solanum stenotomum*, *S. goniocalyx* y *S. phureja*, con el objetivo de asociar seis marcadores moleculares (GP94, HC, NI25, Gro 1-4, RYSC3 y CIP60) con genes mayores de resistencia a tizón tardío (*Phytophthora infestans*), verruga (*Synchytrium endobioticum*), nematodo-quiste (*Globodera pallida* y *G. rostochiensis*) y los virus PVY y PVX (Gabriel et al., 2016).

La presente investigación tuvo como objetivo detectar asociaciones de resistencia a *P. infestans* en accesiones de *S. tuberosum* cultivadas en República Dominicana mediante la detección de polimorfismos utilizando marcadores moleculares SCAR.

MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se desarrolló en los laboratorios de Biología Molecular del Centro de Biotecnología Vegetal (CEBIVE) ubicado en Santo Domingo, República Dominicana, adscrito al Instituto de Innovación en Biotecnología e Industria (IIBI).

Se tomaron seis muestras de tubérculos de papa en 15 fincas de las dos localidades donde se cultiva mayormente en el país: 12 del municipio Constanza (provincia La Vega) y tres de la provincia San José de Ocoa (Cuadro 1). También se colectaron siete materiales diferentes en tiendas comerciales (paquetes de supermercados), los cuales, por sus características fenotípicas, no se cultivan en el país, como la papa 'morada' y 'Petite Gourmet' (Cuadro 1). De este muestreo también fueron establecidas seis plántulas por materiales en la colección *in vitro*.

Producción *in vitro* de explantes de papa para la obtención de ADN. Los tubérculos colectados fueron colocados de manera que se produjera el proceso de brotación, con luz artificial baja (5-10

$\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) para inducir germinación (romper la dormancia). Luego se colocaron los tubérculos sin cortar en tarros de 7,6 L que contenían sustrato

Sunshine mix #4 (mezcla de musgo, perlita, vermiculita y agentes humectantes) en un cobertizo con malla para sombra al 70 %.

Cuadro 1. Descripción de las muestras seleccionadas, lugares de muestreo, calidad y concentración del ADN utilizado en el presente estudio

Muestra No.	Denominación comercial	Lugar de muestreo	R _{260:280}	R _{260:230}	DO ₃₂₀	Concentración de ADN (ng· μL^{-1})
1	F1M4-Granola	MC	1,95	2,05	0,003	557,69
2	F2M3(2)-Maranca	MC	1,91	1,7	-0,019	164,06
3	F3M6-Granola	MC	1,89	2,05	-0,054	390,22
4	F4M1-Granola	MC	1,89	1,93	-0,155	333,005
5	F5M4-Granola	MC	1,93	1,92	-0,166	206,61
6	F6M5(2)- Granola	MC	1,94	2,04	-0,292	320,725
7	F9M1(2)-Atlántica	MC	1,92	1,99	-0,094	376,51
8	F10M3(2)- Granola	MC	1,95	1,85	-0,246	160,195
9	F11M2-Granola	MC	1,93	2,08	-0,055	450,99
10	F12M4-Granola	MC	1,95	2,09	-0,262	370,93
11	F13M5-Granola	MC	1,94	1,88	-0,189	237,76
12	F14M2(2)-Granola	MC	1,91	2,04	-0,111	339,625
13	F15M6-Almenote	TC	1,95	2,02	-0,045	346,55
14	F16M5-Petite Gourmet	TC	1,95	2,11	-0,295	404,88
15	F17M2(2)-Papas Jumbo	TC	1,95	2,18	0,024	261,305
16	F18M6-Vitelotte	PSJO	1,93	1,71	-0,293	209,785
17	F19M1-Granola	PSJO	1,89	1,98	-0,062	243,855
18	F20M1-Granola	PSJO	1,93	2,11	-0,169	467,66
19	F21M6(2)-Vitelotte	TC	1,93	1,34	-0,366	83,685
20	F22M3(2)-Green Giant Fresh	TC	1,83	1,66	-0,052	280,945
21	F23M2-LiderFresh	TC	1,85	1,58	-0,012	143,08
22	F24M1-DoleFresh	TC	1,91	1,82	-0,239	377,56
23	LPC290	CIP	2.00	2.57	0,014	1.504,29
24	CPC336	CIP	1.90	2.41	0,038	645,21

R: absorbancia en nm; DO: densidad óptica; F: finca; M: muestras; LPC: línea de prueba CIP, CPC: control positivo CIP; CIP: Centro Internacional de la Papa (Lima, Perú). MC: municipio Constanza, TC: Tienda Comercial, PSJO: Provincia San José de Ocoa

Cuando los tubérculos generaron una planta completa fueron tomados los últimos tres entrenudos más el brote apical para la extracción de los meristemos. Los meristemos fueron extraídos en cámara de flujo laminar, con un proceso de desinfección en el que se lavaron con agua corriente y jabón líquido neutro (pH 7),

luego se sumergieron en alcohol 95 % por 30 s y posteriormente en una solución de hipoclorito de sodio (3,5 % i.a.) por 15 min, seguido de tres lavados con agua esterilizada.

Se extrajeron brotes meristemáticos con al menos dos hojas, con apoyo de una lupa estereoscópica; los mismos se colocaron en tubos

de ensayo con medio de cultivo Murashige y Skoog (MS) (1962) suplementado con ácido giberélico $0,001 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ y se incubaron en luz artificial (16 h luz y 8 h de oscuridad).

Una vez regeneradas las *in vitro* plantas, se subcultivaron en medio de cultivo MS suplementado con mio-inositol $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, ácido nicotínico $0,5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, piridoxina-HCL $0,5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, tiamina-HCL $0,1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, glicina $2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, sin reguladores de crecimiento. Los explantes diferenciados se cortaron en trozos de 1 cm que contenían una hoja y su yema. Luego se colocaron inclinados en frascos de 200 mL con MS suplementado con kinetina $0,01 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ y ácido giberélico $0,1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Al generar una planta completa se subcultivaron cada 12 días para aumentar la cantidad de plantas. De las plantas obtenidas a partir de los tubérculos brotados (Cuadro 1), se tomaron muestras de hojas (de 20-25 días de edad, aproximadamente) para realizar la extracción de ADN. Del total de muestras seleccionadas el 54 % correspondió a la variedad Granola (que es la más cultivada actualmente en el país, por su valor comercial).

Adicionalmente se utilizaron dos muestras de ADN identificadas como LPC290 y CPC336 (Cuadro 1), las cuales fueron donadas por el Centro Internacional de la Papa (CIP, Lima, Perú), para el análisis. CPC336 ya ha sido caracterizada por el CIP y mostró resistencia, por lo tanto, la utilizamos como control positivo; mientras que LPC290 presenta susceptibilidad y proviene de un material genético aún en desarrollo (líneas F₆), con segregación para algunos marcadores aquí utilizados (L. Portal, Centro Internacional de la Papa, CIP. Comunicación personal).

Extracción de ADN. Se utilizó la metodología propuesta por Dellaporta et al. (1983) modificada por CIAT (1995). Se colocaron 0,2 g del tejido homogeneizado con nitrógeno líquido en un tubo de microcentrífuga de 2 mL y se agregaron 940 μL del buffer de extracción precalentado (100 mM de Tris HCL pH 8,0, 50 mM de EDTA pH 8,0, 500 mM de NaCl, SDS 1,25 %. Se adicionó bisulfito de sodio $0,38 \text{ g}\cdot 100 \text{ mL}^{-1}$ y se incubó a $65 \text{ }^\circ\text{C}$ por 45 min (con agitación cada 5 min); luego se le agregaron 400 μL de acetato de potasio 5 M y se colocaron en hielo durante 30 min. Los microtubos se centrifugaron a 5900 g y $4 \text{ }^\circ\text{C}$ por 10 min; se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo y se agregaron 400 μL de acetato de potasio

5 M. La mezcla se centrifugó por 4 min a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ y se dividió el sobrenadante en dos microtubos de 1,5 mL. Se agregó igual volumen de isopropanol a cada muestra y 1/10 X de acetato de sodio 3M pH 5,2. Se incubó durante 40 min a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$. Luego se centrifugaron los microtubos a 15.616 g por 7 min a $4 \text{ }^\circ\text{C}$. El precipitado se lavó con 400 μL de EtOH 70 % por 3 min. El ADN se secó en un desecador al vacío durante $45 \text{ }^\circ\text{C}$ por 15 min. Finalmente se añadieron 99 μL de tampón TE y 1 μL de RNasaA ($10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) y se resuspendió toda la noche a $4 \text{ }^\circ\text{C}$. Los microtubos se incubaron a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ por 30 min. Se corrió un gel de agarosa al 0,8 % para verificar la calidad del ADN tiñendo con una solución 1X de bromuro de etidio $10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. El ADN se cuantificó en un Nanodrop (Shimatzu BioSpec Nano) (Cuadro 1). Luego se diluyó a una mezcla de trabajo de $100 \text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$.

Amplificación por PCR. La reacción de amplificación de PCR consistió en 2 μL de ADN diluido a $25 \text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$; 1X de buffer PCR (200 mM Tris HCl pH 8,4 y 500 mM de KCl); 0,3 μM de cada cebador (Applied Biosystem), 0,2 μM de cada dNTP, 3 mM de MgCl_2 , 0,5 U de Taq ADN polimerasa (Invitrogen $5\text{U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) y agua libre de nucleasas para completar el volumen final de 10 μL . Las reacciones se sirvieron en placas de 96 pozos, selladas con tiras de polipropileno, y se amplificaron utilizando un termociclador Applied Biosystem modelo Veriti fast. El programa de PCR fue el siguiente: temperatura de desnaturalización $94 \text{ }^\circ\text{C}$ por 5 min, seguido por 35 ciclos de $94 \text{ }^\circ\text{C}$ por 45 s, 45 s a la temperatura de hibridación de cada marcador (Cuadro 2), 45 s a $72 \text{ }^\circ\text{C}$ y un ciclo de extensión de 7 min a $72 \text{ }^\circ\text{C}$. Las amplificaciones se repitieron cuatro veces para confirmar los resultados.

Los productos de amplificación por PCR se colocaron en geles de agarosa al 2 %, adicionando 1 μL de buffer carga (azul de bromofenol, xilencianol, naranja G, sucrosa, TBE 10X y H_2O bidestilada libre de nucleasas), se corrieron en una cámara de electroforesis horizontal (Mini Fotodyne), con buffer TBE 1X (0,89 M de Tris-base, 0,89 M de ácido bórico y 0,5 M de EDTA, pH 8,0) a 200 voltios durante 2 h aproximadamente. Los geles se tiñeron con una solución 1X de bromuro de etidio $10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. Las bandas se visualizaron bajo luz UV y fueron registradas digitalmente con un procesador Samsung Galaxy A6, modelo SM-T280. Con los datos de

amplificación obtenidos para cada marcador se hicieron gráficos, identificando la presencia de

bandas en cada muestra en particular, y se compararon con un marcador alélico de 100 pb).

Cuadro 2. Listado de marcadores SCAR (*sequence characterized amplified region*) utilizados con sus secuencias de oligonucleótidos, tamaños esperados de los fragmentos amplificados, temperatura de hibridación utilizada en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), cromosoma de ubicación de la secuencia y la respectiva referencia

Marcador molecular	Secuencias de oligonucleótidos	Tamaño fragmento esperado (pb)	T _m (°C)	Cromosoma	Referencia
PrP1-F	5'-GTGACATGAGCACATAAGTC-3'	250	64	IX	Ballesteros et al., 2010
PrP1-R	5'-GCAACTTCACTTCTGCCATC-3'				
CosA-F	5'-CTCATTCAAATCAGTTTGTGATC-3'	210	62	V	Juyó et al., 2011
CosA-R	5'-GAATGTTGAATCTTTTGTGAAGG-3'				
RGA2-F	5'-GGCAAGCTCAGAATCAATTATCCACCCCAACTTTTAAAT-3'	635	57	VIII	Beketova et al., 2006
RGA2-R	5'-CAAGTATTGGGAGGACTGAAAGGTGTGGGCATC-3'				
R1-F	5'-CACTCGTGACATATCCTCACCTA-3'	1400	64	V	Ballesteros et al., 2010
R1-R	5'-CAACCCTGGCATGCCACG-3'				
GPI79-F	5'-GGTTTTAGTGATTGTGCTGC-3'	570	64	V	Díaz et al., 2003
GPI79-R	5'-AATTTTCAGACGAGTAGGCACT-3'				
BA47f2-F	5' GGCCGCTCTAGAAGTGTGGATC 3'	650	55	VIII	Juyó et al., 2011
BA47f2-R	5' AGTCTAAAAATTCGACTCTAA 3'				

F: forward, R: reverse, pb: pares de bases, T_m: temperatura de hibridación

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Figura 1 se muestran los resultados obtenidos en las amplificaciones del ADN genómico de las 22 muestras seleccionadas con cada uno de los marcadores moleculares SCAR utilizados para estudiar la presencia o ausencia de resistencia en los materiales de papa al tizón tardío de la papa (*Phytophthora infestans*).

Marcador PrP1. Se constató que las 22 muestras, más el LPC290 y el CPC336, presentaron un fragmento monomórfico entre los 200-300 pb; posiblemente correspondiente al fragmento PrP1₂₅₀ asociado con la resistencia (Figura 1A). Las muestras (2, 16 y 20) tuvieron un fragmento ubicado aproximadamente a los PrP1₂₁₀ mientras que a los PrP1₅₈₀ se presentó un fragmento para las muestras 5-8, 12-15, 17, 18, 21, LPC290 y el CPC336. Para este marcador molecular se obtuvieron un fragmento monomórfico y dos polimórficos, el primero (PrP1₂₅₀) asociado con la resistencia a *P. infestans*. Juyó et al. (2011) obtuvieron un amplicón cercano a PrP1₃₀₀; por su parte Ballesteros et al. (2010) encontraron el fragmento de 250 pb en el 84% de las muestras estudiadas. El fragmento PrP1₆₀₀ señalado por Juyó et al. (2011) es similar a PrP1₅₈₀; también Ballesteros et al. (2010) encontraron un alelo de 550 pb. Juyó et al. (2011) obtuvieron otro amplicón a PrP1₉₀₀. El fragmento PrP1₂₁₀ se

observó en Maranca, Vitelotte y Green Giant Fresh, pero no en Granola, mientras que PrP1580 estuvo muy asociado a esta última variedad. En este caso el marcador estuvo presente en todas las variedades estudiadas y en el CPC336 usado como control positivo de la resistencia.

Marcador CosA: Se observó la amplificación de dos fragmentos, el primero, de aproximadamente 250 pb, presentó polimorfismo en las muestras (2-4, 6-8, 10, 11 y 12-22) y fue el fragmento asociado con la resistencia (Figura 1B). Adicionalmente la muestra 8 y el CPC336 presentaron una banda de 210 pb aproximadamente, también polimórfica para las muestras estudiadas. Este fragmento asociado con la resistencia a *P. infestans*, estuvo presente sólo en esa muestra perteneciente a la variedad Granola. En otras investigaciones con este marcador (Juyó et al., 2011) se obtuvo la amplificación de dos fragmentos característicos, el primero de 250 pb, el cual fue monomórfico y el segundo de 210 pb, polimórfico, entre los materiales estudiados. Ballesteros et al. (2010) encontraron un fragmento monomórfico de 280 pb para las accesiones que evaluaron y no observaron el fragmento de 210 pb asociado con la resistencia.

Marcador RGA2: Presentó dos fragmentos monomórficos para todos los cultivares, CPC336 y LPC290, correspondientes a RGA2₅₀₀ y

RGA2₆₃₅, este último asociado con la resistencia (Beketova et al., 2006) (Figura 1C). Adicionalmente se observó un alelo de 1200 pb

(RGA2₁₂₀₀) en algunos cultivares, que se considera polimórfico para este estudio, no asociado con ninguna variedad en particular.

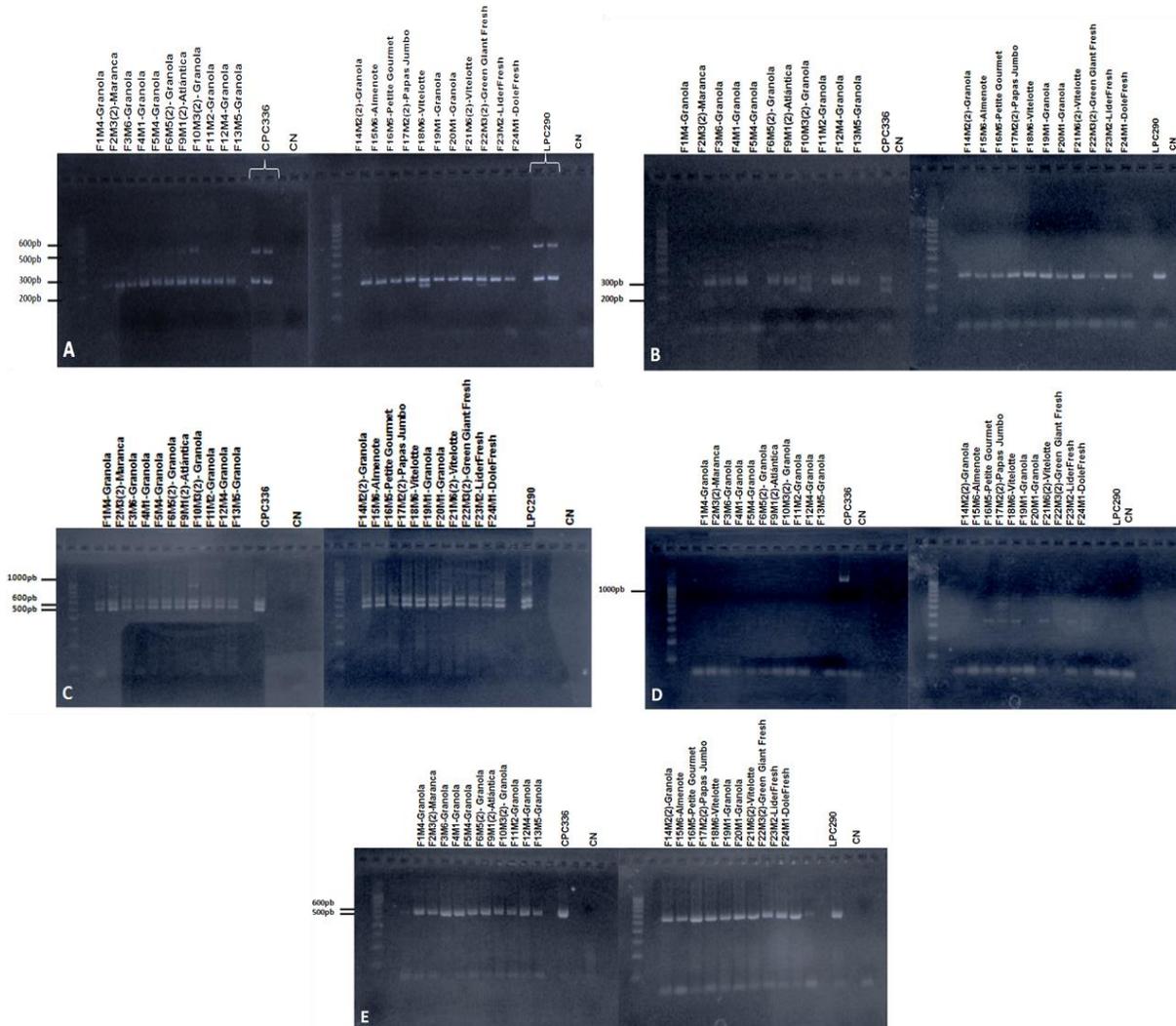


Figura 1. Productos de amplificación PCR obtenidos con los marcadores moleculares tipo SCAR. A. Imágenes de corridas electroforéticas del cebador PrP1 (250 pb). B. Imágenes de corridas electroforéticas del cebador CosA (210 pb). C. Imágenes de corridas electroforéticas del cebador RGA2 (635 pb). D. Imágenes de corridas electroforéticas del cebador R1 (1400 pb). E. Imágenes de corridas electroforéticas del cebador GP179 (570 pb). Marcador alélico (100 pb). Tinción con bromuro de etidio. MA: marcador alélico, LPC290: línea 290 del Centro Internacional de la Papa (CIP, Lima, Perú); CPC336=control positivo y CN: control negativo

Marcador R1: Se obtuvieron cinco fragmentos de pesos moleculares correspondientes a 350, 370, 510, 690 y 1400 pb (Figura 1D). El último fragmento, R1₁₄₀₀, está asociado con la resistencia y se presentó sólo en el CPC336 control positivo

proporcionado por el CIP-Perú. En el trabajo de Juyó et al. (2011) se obtuvieron cinco fragmentos de diferente peso molecular, identificados como R1₂₅₀, R1₅₀₀, R1₈₀₀, R1₁₀₀₀ y R1₁₈₀₀ junto con el fragmento de 1400 pb, los cuales fueron

polimórficos para los individuos estudiados. Ballesteros et al. (2010) encontraron este fragmento sólo en un 19 % de las accesiones estudiadas. El marcador R1 amplifica un fragmento característico del gen *RI* de resistencia.

Marcador GP179: El fragmento GP179₅₇₀, asociado con la resistencia a tizón tardío (Gebhardt et al., 2004) se presentó en todos los materiales evaluados como único fragmento (Figura 1E). Por su parte, Juyó et al. (2011), además de fragmentos de 570 pb, reportó en su estudio fragmentos de 100 y 1000 pb.

Marcador BA47f2: No se obtuvo amplificación para éste. En otros estudios para este marcador el fragmento asociado con resistencia a *P. infestans*, corresponde a 650 pb (Gebhardt et al., 2004) o 500 pb (Juyó et al., 2011). Sin embargo, hay que resaltar que en este último estudio se detectó una ausencia característica del fragmento en algunos de los individuos denominados como resistentes o altamente resistentes al tizón tardío, tal como ocurrió en nuestro trabajo, lo cual sugiere que dichos materiales genéticos no contienen esta secuencia en sus cromosomas.

Los resultados obtenidos con las amplificaciones del ADN genómico de las 22 muestras con cada uno de los marcadores presentaron fragmentos polimórficos para el total de los cultivares (Figura 1). Esos datos correspondieron a alelos relacionados a la resistencia a *P. infestans*, con la excepción del marcador GP179 con un fragmento monomórfico de 570 pb. Los resultados para este marcador guardan algunas similitudes con los encontrados por Ballesteros et al. (2010). Juyó et al. (2011) afirma que los marcadores moleculares CosA, BA47f2, GP179 y PrP1 se encuentran frecuentemente asociados al gen de resistencia R1.

En el caso del marcador PrP1, los alelos resultantes guardaron cierta relación con las variedades estudiadas. Por otra parte, el marcador R1, fragmento característico del gen R1 de resistencia, solo estuvo presente en el control positivo CPC336 para resistencia (procedente del CIP, Perú). Es de hacer notar que el alelo asociado con la resistencia, perteneciente al marcador CosA, sólo se encontró en la muestra de la variedad Granola y en CIP336.

En síntesis, en el presente estudio se presentaron fragmentos polimórficos para el total de los cultivares de papa estudiados dependiendo

específicamente del marcador molecular SCAR seleccionado para evaluar la presencia o ausencia de genes de resistencia al tizón tardío (*P. infestans*), con la excepción del marcador GP179 que presentó un fragmento monomórfico de 570 pb y el marcador BA47f2 que no amplificó.

CONCLUSIÓN

Se identificaron varios alelos relacionados con la resistencia a *P. infestans* en materiales de papa conservados *in vitro* en el Centro de Biotecnología Vegetal (CEBIVE)-IIBI. Una vez ratificados estos resultados a través de pruebas biológicas *in vivo* de inoculación con el patógeno, se espera que estos cultivares puedan ser usados en programas de mejoramiento genético de la papa en el país.

AGRADECIMIENTO

Al Fondo Nacional de Innovación y Desarrollo Científico y Tecnológico del Ministerio de Educación Superior, Ciencia y Tecnología (MESCyT) de la República Dominicana por el financiamiento a este trabajo. A los productores de papa del municipio de Constanza, la provincia San José de Ocoa, al Ing. José Cuevas por su colaboración durante la etapa de muestreo y al Ing. Persio Rodríguez por sus informaciones oportunas.

LITERATURA CITADA

1. Álvarez-Yepes, D., P. Gutiérrez-Sánchez y M. Marín-Montoya. 2017. Secuenciación del genoma del potato yellow vein virus (*pyvvv*) y desarrollo de una prueba molecular para su detección. *Bioagro* 29(1): 3-14.
2. Arens, P., C. Mansilla, D. Deinum, L. Cavellini, A. Moretti, S. Rolland et al. 2010. Development and evaluation of robust molecular markers linked to disease resistance in tomato for distinctness, uniformity and stability testing. *Theor. Appl. Genet.* 120: 655-664.
3. Ballesteros, D., G. Gómez, M. Delgado, M. Álvarez, D. Juyó, D. Cuellar y T. Mosquera. 2010. Posible presencia de un gen R1 en germoplasma de *Solanum tuberosum* Grupo Phureja. *Agro. Col.* 28: 137-146.

4. Bartfort, E. 2013. Crop pests advancing with global warming. *Nature*. doi:10.1038/nature.2013.13644.
5. Beketova, M., Drobyazina P. y E. Khavkin. 2006. The R1 gene for late blight resistance in early and late maturing potato cultivars. *Russian Journal of Plant Physiology* 53: 384-389.
6. Bonierbale, M., W. Amoros, J. Espinoza, E. Mihovilovich, W. Roca y R. Gómez. 2004. Recursos genéticos de la papa: don del pasado, legado para el futuro. Suplemento Revista Latinoamericana de la Papa. pp. 3-14.
7. CIAT. 1995. Protocolos para marcadores moleculares. Unidad de Biotecnología, Publicación N° 258. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Cali, Colombia. 82 p.
8. Dellaporta, S., J. Wood y J. Hick. 1983. A plant DNA miniprep: version II. *Plant Molecular Biology Reporter* 1: 19-21.
9. Díaz, M., D. Fajardo, J. Moreno, C. García y V. Núñez. 2003. Identificación de genes R1 y R2 que confieren resistencia a *Phytophthora infestans* en genotipos colombianos de papa. *Rev. Col. Biotecnol.* 5: 40-50.
10. Fisher, M., D. Henk, C. Briggs, J. Brownstein, L. Madoff y S. McCraw. 2012. Emerging fungal threats to animal, plant and ecosystem health. *Nature* 484: 186-194.
11. Foolad, M. y D. Panthee. 2012. Marker-assisted selection in tomato breeding. *Crit. Rev. Plant Sci.* 31: 93-123
12. Gabriel, J., S. Veramendi, L. Pinto, Pariente, L. y A. Angulo. 2016. Asociaciones de marcadores moleculares con la resistencia a enfermedades, caracteres morfológicos y agronómicos en familias diploides de papa (*Solanum tuberosum* L.). *Rev. Col. Biotecnol.* 18: 17-32.
13. Gebhardt, C., A. Ballvora, B. Walkemeier, Oberhagemann, P. y K. Schöler. 2004. Assessing genetic potential in germplasm collections of crop plants by marker-trait association: a case study for potatoes with quantitative variation of resistance late blight and maturity type. *Mol. Breed.* 13: 93-102.
14. Jiang, R., J. Li, Z. Tian, J. Du, M. Armstrong, K. Baker et al. 2018. Potato late blight field resistance from QTL dPI09cis conferred by the NB-LRR gene R8. *J. Exp. Bot.* 69: 1545-1555.
15. Haverkort, A. y A. Verhagen. 2008. Climate change and its repercussions for the potato supply chain. *Potato Research* 51: 223.
16. Juyó, D., H. Genera y T. Mosquera. 2011. Evaluación de marcadores moleculares asociados con resistencia a gota (*Phytophthora infestans* L.) en papas diploides y tetraploides. *Rev. Col. Biotecnol.* 13: 51-62.
17. MAPRE. (Ministerio Administrativo de la Presidencia) 2018. <https://mapre.gob.do/ministerios-republica-dominicana/agricultura/> (consulta del 09/08/2018).
18. Mosquera, T., C. Fernández, L. Martínez, Acuña, A. y D. Cuéllar. 2008. Genética de la resistencia de la papa (*Solanum tuberosum*) a patógenos. *Agronomía Colombiana* 26: 7-15.
19. Murashige T. y F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-494.
20. Nelson, G., M. Rosegrant, A. Palazzo, I. Gray, C. Ingersoll, R. Robertson et al. 2010. Food security, farming, and climate change to 2050: Scenarios, results, policy options. IFPRI Research Monograph. doi: 10.2499/9780896291867.
21. Randall, E., V. Young, H. Sierotzki, G. Scalliet, R. Birch, E. Cooke et al. 2014. Sequence diversity in the large subunit of RNA polymerase I contributes to Mefenoxam insensitivity in *Phytophthora infestans*. *Molecular Plant Pathology* 15: 664-676.
22. Rodewald J. y B. Trognitz. 2013. *Solanum* resistance genes against *Phytophthora infestans* and their corresponding avirulence genes. *Molecular Plant Pathology* 14: 740-757.
23. Rodríguez, R. y M. Santos. 2002. Experiencias en la multiplicación de semilla de papa a partir de vitro plántulas. Instituto Dominicano de Investigaciones Agropecuarias y Forestales (IDIAF). Boletín Técnico del Programa Nacional de Raíces y Tubérculos (PR&T) y Programa Regional Cooperativo de Papa (Precodepa). 6 p.
24. Tan, M., R. Hutten, R. Visser y H. van Eck. 2010. The effect of pyramiding *Phytophthora infestans* resistance genes R_{Pi-mcd1} and R_{Pi-ber} in

potato. *Theor. Appl. Gen.* 121: 117-125.

25. Visser, R., C. Bachem, J. de Boer, G. Bryan, S. Chakrabarti, R. Feingold et al. 2009. Sequencing the potato genome: Outline and first results to come from the elucidation of the sequence of the world's third most important

food crop. *Amer. J. Potato Res.* 86: 417-429.

26. Vleeshouwers, V., S. Raffaele, J. Vossen, N. Champouret, R. Oliva, M. Segretin et al. 2011. Understanding and exploiting late blight resistance in the age of effectors. *Ann. Rev. Phytopathology* 49: 507-531.