

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE AGRONOMÍA**

**LA RESISTENCIA A LA MARCHITEZ BACTERIANA DE *Solanum
commersonii* Dun. Y SU UTILIZACIÓN EN EL MEJORAMIENTO GENÉTICO
DE PAPA**

por

Matías GONZÁLEZ ARCOS

**TESIS presentada como uno de los
requisitos para obtener el título de
Magister en Ciencias Agrarias opción
Ciencias Vegetales.**

**MONTEVIDEO
URUGUAY
2010**

Tesis aprobada por el tribunal integrado por la Ing. Agr. PhD. Elsa Camadro, la Dra. María Julia Pianzzola, la Ing. Agr. PhD. Clara Pristch, el Ing. Agr. PhD. Pablo Speranza y el Ing. Agr. Dr. Marco Dalla Rizza, el 2 de diciembre de 2010.
Autor: Ing. Agr. MSc. Matías González Arcos. Director Ing. Agr. Dr. Guillermo Galván, Co-director Ing. Agr. PhD. Francisco Vilaró.

AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIA

Agradezco a:

Mis tutores Guillermo Galván y Francisco Vilaró que dedicaron trabajo y tiempo en mi formación.

Mis compañeros de trabajo del INIA que de alguna forma colaboraron en que pudiera realizar esta tesis sin desvincularme de otras actividades de investigación: Gustavo Rodríguez, Alberto Lenzi, Gustavo Giménez, Cecilia Berrueta, Peter Schlenzack, Alicia Castillo, Esteban Vicente, Ariel Manzoni, Walter Spina, Brian Ghelfi, Juan R. Ferreira, Cándido Ferreira y Leonardo Chagas.

Clara Pritsch, Pablo Speranza, María Julia Pianzola y Elsa Camadro por las correcciones, sugerencias, la confianza y el apoyo.

El INIA y la Facultad de Agronomía que me dieron la oportunidad de realizar la maestría.

Dedico este trabajo a Anita, soporte fundamental de este proceso y de mi vida.

TABLA DE CONTENIDO

	PÁGINA DE APROBACIÓN.....	II
	AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIA.....	III
	ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS.....	VII
	RESUMEN.....	X
	SUMMARY.....	XI
1	<u>INTRODUCCIÓN</u>	1
	1.1. EL GERMOPLASMA DE PAPA.....	1
	1.2. LA MARCHITEZ BACTERIANA.....	3
	1.3. ESTRATEGIAS DE CONTROL: LA RESISTENCIA GENÉTICA.....	6
	1.4. JUSTIFICACIÓN DE ESTE TRABAJO.....	9
	1.5. OBJETIVOS.....	11
2	<u>APORTES AL CONOCIMIENTO DE LA RESISTENCIA A LA MARCHITEZ BACTERIANA DE LA PAPA EN <i>Solanum commersonii</i> Dun. BAJO CONDICIONES DE INOCULACIÓN CONTROLADAS....</u>	13
	2.1. INTRODUCCIÓN.....	15
	2.2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	19
	2.2.1. <u>Material vegetal</u>	19
	2.2.2. <u>Cruzamientos</u>	20
	2.2.3. <u>Cepas de <i>R. solanacearum</i> y condiciones de cultivo....</u>	20
	2.2.4. <u>Evaluación de la resistencia al marchitamiento bacteriano</u>	21

2.2.5.	<u>Análisis de los datos</u>	23
2.3.	RESULTADOS.....	24
2.3.1.	<u>Evaluación de la resistencia al marchitamiento bacteriano en genotipos de <i>S. commersonii</i> colectados en Uruguay</u>	24
2.3.2.	<u>Cruzamiento entre genotipos de <i>S. commersonii</i> R y MS y obtención de una progenie F1</u>	27
2.3.3.	<u>Distribución de niveles de resistencia dentro de la progenie</u>	27
2.3.4.	<u>Interacción genotipo por cepa</u>	32
2.4.	DISCUSIÓN.....	35
2.5.	BIBLIOGRAFÍA.....	42
3	<u>INTROGRESIÓN DE LA RESISTENCIA A LA MARCHITEZ BACTERIANA DE <i>Solanum commersonii</i> Dun. EN EL MEJORAMIENTO DE PAPA DE URUGUAY</u>	47
3.1.	INTRODUCCIÓN.....	49
3.2.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	53
3.2.1.	<u>Material vegetal</u>	53
3.2.2.	<u>Evaluación de la resistencia al marchitamiento bacteriano</u>	55
3.2.3.	<u>Estimación de la fertilidad del polen y conteo de número de cromosomas</u>	57
3.3.	RESULTADOS.....	57
3.3.1.	<u>Primer paso de introgresión: <i>S. commersonii</i> x <i>S. phureja</i></u>	57

3.3.2.	<u>Segundo paso de introgresión: (<i>S. commersonii</i> x <i>S. phureja</i>) x <i>S. tuberosum</i>.....</u>	61
3.3.3.	<u>Conteo de cromosomas</u>	63
3.4.	DISCUSIÓN.....	66
3.5.	BIBLIOGRAFÍA.....	71
4	<u>CONCLUSIONES GENERALES</u>	76
5	<u>BIBLIOGRAFÍA GENERAL</u>	79

ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS

	Pág.
Cuadros	
<u>Capítulo 1</u>	
1 Correspondencia entre filotipos, secuevares y rango de hospederos cultivados para las razas 1 y 3 del complejo <i>Ralstonia solanacearum</i> (adaptado con datos de Fregan y Prior, 2005).....	6
<u>Capítulo 2</u>	
1 Proporción de plantas con marchitamiento a los 28 días posteriores a la inoculación con la cepa UR036 de la raza 3 biovar 2 de <i>R. solanacearum</i> en 32 accesiones de <i>S. commersonii</i> colectadas en Uruguay. Se incluyen dos genotipos de <i>S. phureja</i> (192 y 195) y un genotipo de <i>S. tuberosum</i> ssp. <i>tuberosum</i> cv `Chieftain´ incluido como control susceptible.....	26
2 Eficiencia en los cruzamientos entre el genotipo de <i>S. commersonii</i> 0502.6 (R) y el genotipo 04203.4 (MS).....	27
3 Proporción de plantas marchitas mínima, máxima, promedio y número de genotipos dentro de cada grupo conformado en el análisis de conglomerados. Fueron evaluados 111 genotipos F1 provenientes del cruce entre los parentales de cmm 05.02.6 y 04203.4.....	30
4 Proporción de plantas enfermas estimada e intervalo de confianza (95% de probabilidad) para los genotipos utilizados en el experimento de interacción genotipo por cepa. Datos obtenidos de la inoculación de la población segregante con la cepa UY043.....	32
5 Efecto de las diferentes fuentes de variación para el experimento de interacción genotipo por cepa.....	33
6 Proporción de plantas enfermas a los 28 días post inoculación para los diferentes genotipos elegidos y las diferentes cepas utilizadas en el experimento de interacción genotipo por cepa.....	35

Capítulo 3

1	Individuos utilizados en los cruzamientos del primer paso de la introgresión: <i>S. commersonii</i> x <i>S. phureja</i>	58
2	Cruzamientos realizados en el primer paso de la introgresión (<i>S. commersonii</i> x <i>S. phureja</i>) y sus eficiencias.....	59
3	Evaluación de la resistencia a marchitez bacteriana en las progenies 04.02.3 x 195 y 05.02.6 x 192, obtenidas en el primer paso de la introgresión (<i>S. commersonii</i> x <i>S. phureja</i>).....	60
4	Características de los individuos utilizados en los cruzamientos del segundo paso de la introgresión: (<i>S. commersonii</i> x <i>S. phureja</i>) x <i>S. tuberosum</i>	61
5	Eficiencia de los cruzamientos realizados en el segundo paso de la introgresión: (<i>S. commersonii</i> x <i>S. phureja</i>) x <i>S. tuberosum</i>	62
6	Fertilidad del polen estimada para los genotipos obtenidos del cruzamiento (<i>S. commersonii</i> x <i>S. phureja</i>) x <i>S. tuberosum</i>	62
7	Evaluación de la resistencia a marchitez bacteriana en las progenies (<i>S. commersonii</i> x <i>S. phureja</i>) x <i>S. tuberosum</i> , obtenidas del el segundo paso de la introgresión.....	63
8	Número de cromosomas en células somáticas de algunos genotipos que participaron del proceso de introgresión.....	64

Figuras

Capítulo 1

1	Cronología de los procesos de identificación y utilización de resistencia genética a la marchitez bacteriana en programas de mejoramiento de papa. Los recuadros indican las diferentes fuentes de resistencia incorporadas en esquemas de introgresión.....	8
---	--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	---

Capítulo 2

1	Evolución en el tiempo de la proporción de plantas con síntomas de marchitamiento para cinco genotipos de <i>S. commersonii</i> , un clon de <i>S. phureja</i> (192) y el testigo susceptible cv. 'Chieftain' <i>S. tuberosum</i> ssp. <i>tuberosum</i>	25
2	Proporción de plantas con marchitamiento en cada uno de los 134 genotipos de <i>S. commersonii</i> de la progenie F1 (05.02.6 x 04.203.4) inoculados con la cepa UY043 de la raza 3 biovar 2 de <i>R. solanacaerum</i>	28
3	Proporción de plantas marchitas (P) e intervalo de confianza para cada genotipo de la progenie F1 cmm (05026 x 04.203.4) a los 28 días posteriores a la inoculación.....	29
4	Análisis de conglomerado utilizando como medida de distancia las diferencias entre las proporciones de plantas enfermas estimadas de cada uno de los genotipos que participaron del análisis estadístico.....	31
5	Comportamiento de los diferentes genotipos inoculados con cinco cepas de <i>Ralstonia solanacearum</i> aisladas en Uruguay, en el experimento de interacción genotipo por cepa.....	34

Capítulo 3

1	Esquema de cruzamientos utilizado para la introgresión de <i>S. commersonii</i> en el genoma de <i>S. tuberosum</i> . Se divide en dos pasos que culminan, respectivamente, con la obtención de híbridos triploides y pentaploides.....	55
2	Inflorescencias de algunos individuos que participaron del proceso de introgresión.....	65

LA RESISTENCIA A LA MARCHITEZ BACTERIANA DE *Solanum commersonii* Dun. Y SU UTILIZACIÓN EN EL MEJORAMIENTO GENÉTICO DE PAPA

RESUMEN

Solanum commersonii (cmm) es una especie silvestre de papa destacada por su resistencia a MB. Los estudios que determinaron esta característica se basaron en pocos genotipos o utilizaron métodos de inoculación poco representativos. Además, el uso de cmm en el mejoramiento de papa ha sido limitado (entre otros factores) por barreras de incompatibilidad a nivel del endosperma. Para contribuir al conocimiento de la resistencia de cmm a la MB y comenzar su utilización en el mejoramiento de papa en Uruguay, se ajustó una metodología de inoculación en suelo bajo condiciones ambientales controladas. Se caracterizaron diferentes genotipos de cmm colectados en distintas regiones de Uruguay. Se confirmó que existe variabilidad para la resistencia a MB en cmm, encontrándose elevados niveles de resistencia. Mediante el cruzamiento de dos genotipos de cmm se obtuvo una progenie que fue caracterizada por resistencia. La distribución de los niveles de resistencia en la progenie indicaría en forma preliminar un control poligénico. En un ensayo factorial utilizando cinco cepas de Rs de Uruguay y cinco genotipos de cmm no se observó interacción entre genotipo y cepa en la resistencia. Por otro lado, genotipos de cmm fueron incluidos en un esquema de introgresión basado en cruzamientos sexuales dirigidos, utilización de gametos con el número cromosómico no reducido, y *Solanum phureja* como especie puente. Fueron obtenidos clones que presentaron buenos niveles de resistencia a MB y que pueden ser usadas en cruzamientos directos con especies 4x; 4EBN.

Palabras clave: Gametos 2n, *Ralstonia solanacearum*, *Solanum phureja*, *Solanum tuberosum*.

RESISTANCE TO BACTERIAL WILT OF *Solanum commersonii* Dun. AND ITS USE IN POTATO BREEDING

SUMMARY

Solanum commersonii (cmm) is a wild tuber-bearing potato highlighted for its resistance to BW. Studies to determine BW resistance were based in few cmm genotypes, and the genetic control of resistance is unknown. Moreover, the use of this resistance has been limited (inter alia) by incompatibility barriers at endosperm level. To contribute to the knowledge of cmm resistance to BW and begin use in potato breeding in Uruguay, it was adjusted a screening method under controlled conditions. It was confirmed that there is variability for resistance to MB in cmm, founding high levels of resistance. Via the cross of two contrasting responses clones it was obtained a BW segregating family. Regarding the distribution of levels of resistance, it was preliminary postulated that genetic control of BW resistance could be polygenic. In addition, a factorial experiment with five Rs strains and six cmm clones did not show specific strain x clon interactions in BW resistance. On the other hand, a scheme for introgression of BW resistance into tbr germplasm was set in practice on the basis of sexual crosses. Some resistant cmm clones were used in an introgression scheme based on sexual inter-specific crosses, non-reduced 2n gametes, and the use of *Solanum phureja* as bridge species. Clones carrying high BW resistance and potentially good crossability with 4x; 4EBN especies were obtained.

Key words: 2n-gametes, *Ralstonia solanacearum*, *Solanum phureja*, *Solanum tuberosum*

INTRODUCCIÓN

1.1. EL GERMOPLASMA DE PAPA

La papa cuenta con varias especies cultivadas y silvestres relacionadas que crecen en diversas regiones del continente americano, desde el centro-sur de Chile, pasando por América central hasta el sur-oeste de Estados Unidos (Hijmans y Spooner, 2001). Todas estas especies poseen el mismo número básico de cromosomas ($x=12$) y difieren en la ploidía, que va desde especies diploides ($2n=2x=24$) a hexaploides ($2n=6x=72$) (Hawkes, 1994).

La taxonomía de la papa está en constante revisión. De acuerdo con la clasificación de Hawkes (1990) existen más de 219 especies tuberosas del género *Solanum* que están divididas en 19 series que se encuentran incluidas en la sub-sección *Potatoe* dentro de dos super-series: *Stellata* y *Rotata*. Posteriormente a esta clasificación hubo una tendencia a agrupar algunas especies simplificando el ordenamiento. Spooner y Hijmans (2001) reconocieron 196 especies tuberosas silvestres.

La papa cultivada pertenece a la serie *Tuberosa*. El vínculo más estrecho con las especies silvestres se encuentra dentro de la misma serie en el “complejo brevicaule”, grupo de especies diploides morfológicamente variable. El origen de la papa cultivada ha sido descrito como el resultado de numerosas hibridaciones entre miembros de este complejo, seguidas de duplicaciones cromosómicas que dieron lugar al estado tetraploide (Van den Berg y Jacobs, 2007).

Según Hawkes (1990) siete especies de la sub-sección *Potatoe* son cultivadas por sus tubérculos: *Solanum ajanhuiri*, *S. chaucha*, *S. curtilobum*, *S. juzepczukii*, *S. phureja*, *S. stenotomum* y *S. tuberosum* con sus dos

subespecies, *tuberosum* y *andigenum*. Dada la intervención del hombre en la modificación de los patrones evolutivos de las mismas, se pone en discusión el taxón “especie”. Huamán y Spooner (2002) propusieron una denominación a partir de la diferenciación de ocho “grupos cultivados” dentro de una sola clase (*S. tuberosum*): Grupo Ajanhuiri, Grupo Juzepczukii, Grupo Curtilobum, Grupo Chilotanum, Grupo Andigenum, Grupo Chaucha, Grupo Phureja, Grupo Stenotomum. El grupo que comprende los cultivares modernos de *S. tuberosum* ssp. *tuberosum* no fue incluido en esa clasificación. Anteriormente había sido nombrado por Dodds (1962) como “grupo Tuberosum”.

El germoplasma de papa cultivado en latitudes altas (con una duración del día de 14 a 18 horas) pertenece en su gran mayoría a *S. tuberosum* ssp. *tuberosum*. Este germoplasma se originó en el sur de Chile a partir de selección adaptativa de *S. tuberosum* subsp. *andigenum*, originaria de los Andes Sudamericanos. El mismo proceso con 200 años de selección habría sido realizado a partir de las primeras papas que viajaron desde los Andes a Europa en el siglo XVI (Hawkes, 1994). Algunos autores comprobaron que la subsp. *tuberosum* (tanto de origen sudamericano como europeo) difiere de la subsp. *andigenum* en algunos factores citoplasmáticos que habría adquirido de especies silvestres sudamericanas de latitudes altas como *S. chacoense* (Grun, 1979, 1990). Esto probaría la participación de estas especies sudamericanas en la adaptación de la papa al Viejo Mundo. Este aporte habría sido efectivo a partir de 1840, luego de la epifitía de tizón tardío (*Phytophthora infestans*).

Actualmente la papa es el cuarto cultivo alimenticio más importante del mundo, después del maíz, trigo y arroz, con una producción anual que supera las 300 millones de toneladas (Centro Internacional de la Papa (CIP), 2009). Su valor nutritivo por unidad de superficie cultivada es dos a tres veces mayor que el de los cereales. Es una gran fuente de calorías, proteínas y vitamina C entre otros nutrientes importantes (Bamberg y del Río, 2005). Su producción en el

mundo crece a una tasa mayor que la de otros cultivos importantes (CIP, 2009). Este aumento está sustentado por el gran crecimiento productivo de China e India en los últimos años. La amplia adaptación del cultivo a diferentes ambientes y la diferencia entre los rendimientos promedio y máximos alcanzables en diversas regiones, son indicadores de la potencialidad para el crecimiento del cultivo en el mundo (CIP, 2009).

En Uruguay la papa es el principal cultivo hortícola tanto en producción como en superficie cultivada. Anualmente se plantan entre seis y ocho mil hectáreas, con una productividad media que ronda los 16 mil kg ha⁻¹ (Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca - Dirección de Estadística Agropecuaria. (MGAP-DIEA), 2009). Los cultivares más utilizados son pertenecientes al grupo Tuberosum y tienen tubérculos de piel roja. A fines de 1970 se comenzó a realizar mejoramiento genético local. En un primer período el programa de mejoramiento incorporó germoplasma de papa derivado de diferentes esquemas de introgresiones entre especies silvestres y cultivadas, en su mayoría proveniente del CIP. El objetivo fue incorporar resistencia a virosis y a tizones (*Alternaria solani* y *Phytophthora infestans*), así como también reducir la duración del ciclo y acortar el período de dormición. Producto de este proceso son los cultivares 'INIA Iporá' e 'INIA Yaguarí' que hoy ocupan 15% de la superficie total plantada (Francisco Vilaró, 2009, com. pers.). Hasta el momento, no se han implementado en Uruguay estrategias que permitan la generación de germoplasma que incorpore especies silvestres locales.

1.2. LA MARCHITEZ BACTERIANA

La Marchitez Bacteriana (MB) de la papa, causada por la bacteria *Ralstonia solanacearum*, es la segunda enfermedad por su importancia en el cultivo de papa en el mundo. Produce severas pérdidas en regiones con clima

tropical y subtropical. La enfermedad también puede ocurrir en climas templados como son las regiones de altitud elevada en los trópicos (CIP, 2007). La marchitez bacteriana afecta a 1,5 millones de hectáreas al año en alrededor de 80 países, con pérdidas de US\$ 950 millones (Walker y Collion, 1998).

El inóculo inicial de la enfermedad se encuentra en el suelo o en el tubérculo “semilla”. Penetra a la planta por heridas en las raíces o simplemente se traslada desde el tubérculo madre al resto de la planta por el sistema vascular. Con condiciones ambientales favorables para la enfermedad el patógeno se multiplica en los tallos causando marchitamiento, amarillamiento y secado total de las plantas. En climas frescos, cuando las temperaturas no son lo suficientemente altas, el síntoma más común que afecta los tubérculos es el amarronamiento de los vasos vasculares junto con el exudado en forma de zooglea por los ojos y por la inserción del estolón. Con temperaturas frías es común que la bacteria no provoque síntomas visibles y se disemine en forma de infección latente a partir de los tubérculos “semilla” (aparentemente) sanos. Este aspecto junto con la sobrevivencia del patógeno en el suelo, el agua y las malezas son los principales factores que dificultan su control (Hayward, 1991).

La gran diversidad del patógeno ha llevado a los autores a referirse al “complejo” *Ralstonia solanacearum*, que afecta a más de 30 familias de plantas, incluyendo especies cultivadas y silvestres (entre ellas algunas malezas del cultivo de papa). Tradicionalmente el patógeno es agrupado en cinco razas, de acuerdo al rango de hospedantes, y en seis biovars, en base a la capacidad de utilización de distintos disacáridos y alcoholes. Las razas 1 y 3 son las únicas que afectan cultivos de papa. La raza 3 (biovar 2) es común en climas frescos (latitudes bajas y regiones de altitud en los trópicos) y afecta principalmente a la papa bajo estas condiciones. Con temperaturas más elevadas prevalece la raza 1 (biovar 1, 3 o 4) la cual afecta a un gran número

de cultivos (papa, tabaco, tomate, berenjena, morrón, plátano, maní) y a varias especies no cultivadas (CIP, 2007).

Cook y Sequeira (1994) utilizando RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) propusieron clasificar a *R. solanacearum* en dos divisiones según el biovar y origen geográfico del aislamiento. Más recientemente, Fegan y Prior (2005) realizaron una clasificación en cuatro filotipos (I, II, III y IV) mediante la agrupación de datos de análisis de secuencias del gen endoglucanasa. Cada filotipo es compuesto por un número de secuevares. Esta clasificación representa mejor la diversidad que hoy día conocemos del complejo *Ralstonia solanacearum*. Como se muestra en el cuadro 1, en la raza 1 hay correspondencia entre su amplio rango de hospederos y su gran diversidad genética. Por otro lado la raza 3 es un grupo muy homogéneo genéticamente.

En Uruguay, Siri *et al.* (2007) caracterizaron más de veinte cepas de *Ralstonia solanacearum* aisladas de cultivos de papa de las principales zonas productoras de país. La totalidad de las muestras correspondió al Filotipo II, Secuevar 1-2 (raza 3 biovar 2A). Esto coincide con la adaptación ambiental de esta variante del patógeno a un ambiente templado típico de latitudes medias a altas. La incidencia de la enfermedad normalmente se sitúa por debajo del 10% del área plantada, aunque en años donde las condiciones ambientales son favorables (semilla contaminada, alta humedad y temperatura) ha alcanzado el 34% (MGAP-DIEA, 2002). La enfermedad causa daños directos en cuanto a la pérdida de producción, y también deben cuantificarse daños indirectos, al comprometer sanitariamente la semilla que se destinaría para la siguiente zafra y al inhabilitar por varios años los campos infectados. Al ser la semilla y el recurso suelo los principales componentes del costo de producción del cultivo, se considera que la marchitez bacteriana es una enfermedad de alto riesgo para los sistemas productivos.

Cuadro 1. Correspondencia entre filotipos, secuevares y rango de hospederos cultivados para las razas 1 y 3 del complejo *Ralstonia solanacearum* (adaptado de Fegan y Prior, 2005).

Raza	Filotipo	Secuevares	Hospederos
1	I, II, III y IV	5, 7-23	papa, tabaco, tomate, berenjena, morrón, plátano, maní.
3	II	1 y 2	papa

1.3. ESTRATEGIAS DE CONTROL: LA RESISTENCIA GENÉTICA

Las consecuencias de la MB se ven agravadas por la ausencia de tratamientos curativos efectivos. A su vez, la gran diversidad genética del patógeno junto con el desconocimiento de algunos mecanismos para su diseminación, persistencia, y mecanismos de patogenicidad han obstaculizado el desarrollo de medidas efectivas para su manejo (Saddler, 2005). En regiones donde el patógeno es endémico solo medidas evasivas son viables para el control (Zimnoch-Guzowska *et al.*, 2005). Estas medidas incluyen el uso de semilla sana, campos libres del patógeno, rotación con cultivos no hospederos, control de nematodos, uso de semilla entera y utilización de agua no contaminada. En zonas donde el patógeno no es endémico las medidas de control se restringen al exhaustivo control del material de plantación.

Al igual que sucede con otras enfermedades bacterianas, la resistencia genética se vuelve una herramienta clave en el diseño de una estrategia de control integrado. En el caso de la MB, sin embargo, la generación y utilización de germoplasma con niveles estables de resistencia al marchitamiento ha sido muy limitada en el cultivo de papa (Zimnoch-Guzowska *et al.*, 2005). Cultivares como 'Achatt' de origen Alemán (*S. tuberosum* ssp. *tuberosum* x germoplasma

de especies silvestres), 'Molinera' de origen peruano (*S. phureja* x *S. tuberosum* ssp. *tuberosum*) y 'Cruza-148' de origen mexicano (pedigrí desconocido), poseen resistencia parcial de campo y están entre los escasos ejemplos.

Los esfuerzos por identificar y utilizar la resistencia a la MB proveniente de germoplasma cultivado y silvestre de papa se han venido realizando por más de 40 años (Figura 1). Desde los inicios se han incorporando diferentes fuentes de resistencia como *S. phureja*, *S. chacoense*, *S. raphanifolium*, *S. sparsipilum* y *S. multidissectum*, involucrando a programas de mejoramiento de varios países. La cooperación internacional ha hecho posible la realización coordinada de cruzamientos, tamizado con diferentes razas de *Ralstonia solanacearum* y la selección de genotipos promisorios. A principios de la década de 2000, se logró la obtención de materiales genéticos avanzados con apariencia de tubérculo aceptable y las siguientes características: i) buena resistencia de campo al marchitamiento causado por la raza 3 y por la raza 3 + raza 1, igual o mayor que los testigos 'Molinera' y 'Cruza 148' (Priu *et al.*, 2005; Carlos Lopes, comunicación personal, junio de 2009); ii) ausencia de resistencia a la latencia de la infección en tubérculos asintomáticos (Priu *et al.*, 2005).

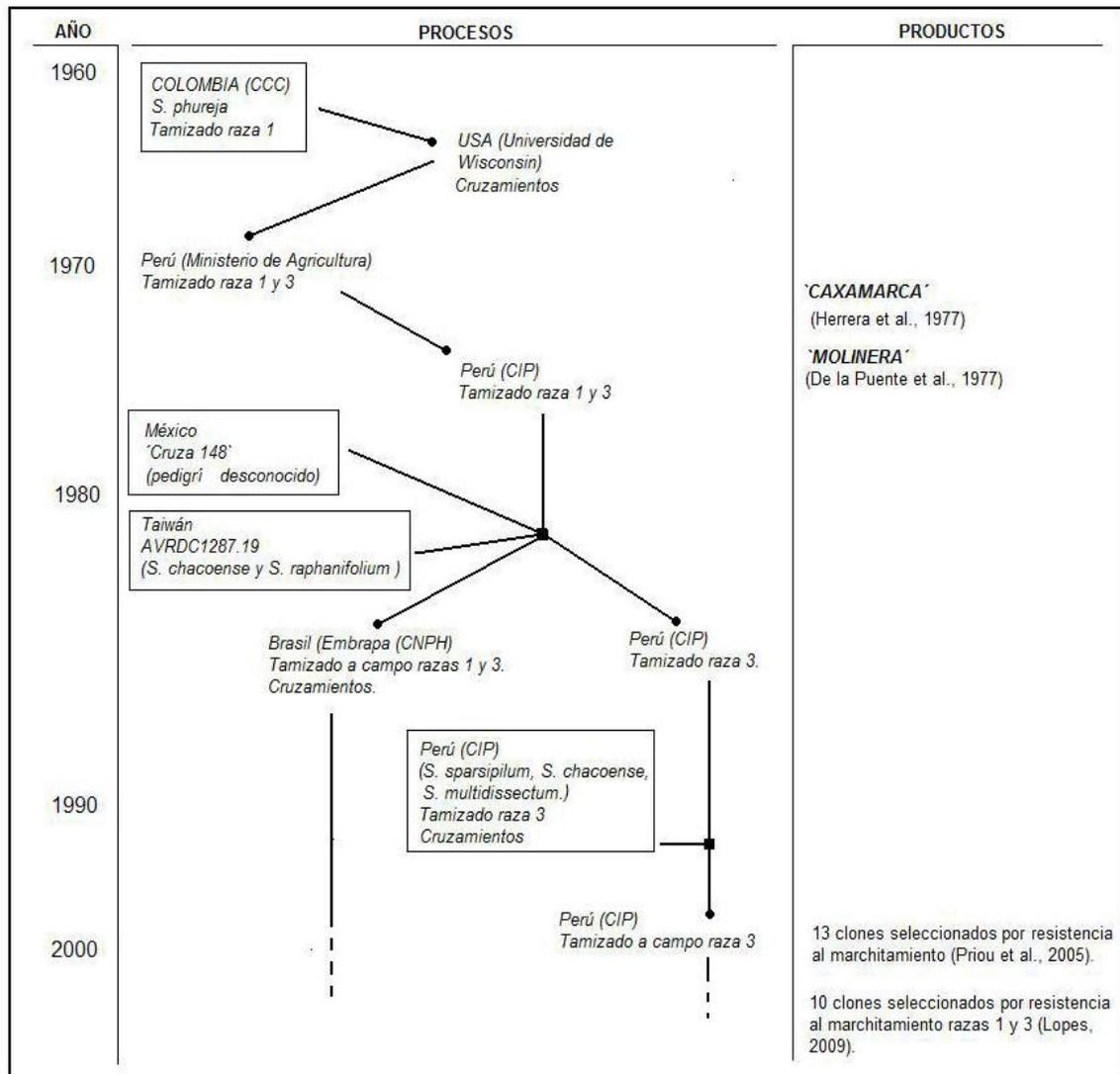


Figura 1. Cronología de los procesos de identificación y utilización de resistencia genética a la marchitez bacteriana en programas de mejoramiento de papa. Los recuadros indican las diferentes fuentes de resistencia incorporadas en esquemas de introgresión. Elaboración propia en base a datos de Schmediche, P. (1988), Priou S. *et al.* (2005), Carlos Lopes y Matilde Orrillo, comunicación personal, junio de 2009.

1.4. JUSTIFICACIÓN DE ESTE TRABAJO

A partir de los avances mencionados, se considera oportuno comenzar a explorar nuevas fuentes de resistencia a la MB que superen o complementen el actual nivel alcanzado y aporten estabilidad a esta característica. A su vez, nuevas fuentes de resistencia permitirían generar más opciones en la búsqueda de la resistencia a la latencia de la bacteria en tubérculos asintomáticos.

Uruguay forma parte del centro de diversidad primario de *S. commersonii* Dun. (Hawkes, 1990), especie tuberosa diploide que ha sido destacada desde décadas atrás por su alta potencialidad para el mejoramiento de papa debido a su resistencia al frío y a sequía (Reddick, 1930; Palta y Simon, 1993; Chen *et al.*, 1999; Carputo *et al.* 2007). Entre las resistencias a los factores bióticos identificados en esta especie, además de la resistencia a virus y hongos, se destaca precisamente la alta resistencia a la marchitez bacteriana (Laferriere *et al.* 1999; Kim-Lee *et al.* 2004; Galván *et al.* 2006; Carputo *et al.* 2009; Siri *et al.*, 2009).

Kim-Lee *et al.* (2004) y Siri *et al.* (2009) trabajaron con varios genotipos y confirmaron que la característica es variable dentro de la especie *S. commersonii*. Por lo tanto, existe la necesidad de evaluar el germoplasma local con el fin de identificar los genotipos más resistentes para usarlos en programas de pre-mejoramiento. Debido a la gravedad de la enfermedad y la imposibilidad de contar con regiones aisladas para la producción de semilla a nivel nacional, los métodos de tamizado a campo son de difícil aplicación en Uruguay. Por tal motivo, adaptar un sistema de inoculación bajo condiciones controladas y que represente la interacción huésped-patógeno natural sería de gran utilidad para la caracterización del germoplasma local de esta especie.

La raza 3 biovar 2 de *R. solanacearum* es la única presente en las regiones paperas de Uruguay. Esta raza cuenta con muy poca variabilidad

genética. Sin embargo, se han encontrado cepas con mayor virulencia (mayor proporción de plantas muertas) cuando son inoculadas en un mismo genotipo hospedero (M. I. Siri com. pers.). Determinar si estas diferencias son debidas únicamente a un efecto cepa o son producto de una interacción genotipo por cepa contribuiría a definir que tipo de inóculo sería el más recomendado a la hora de tamizar genotipos para resistencia a la MB causada por la raza 3 biovar 2 de *R. solanacearum*.

En este contexto, si bien trabajos previos han confirmado altos niveles de resistencia a la MB, no se han generado conocimiento sobre la posible base genética de esta característica. Algunos trabajos exploratorios realizados en *S. commersonii* por Galván *et al.* (2006) y Siri *et al.* (2009) muestran que, ante un método agresivo de inoculación en suelo y planta, algunas accesiones se comportaron como asintomáticas. Determinar en qué medida esta resistencia es transmisible por vía sexual en un trasfondo genético susceptible puede aportar a conocer la posible base genética de la resistencia en esta especie.

Desafortunadamente, el uso de *S. commersonii* en el mejoramiento genético de *S. tuberosum* ha sido limitado por barreras a la hibridación post-cigóticas. Estas barreras se explican en la teoría del Número de Balance del Endosperma (EBN) (Johnston *et al.* 1980, Hanneman, 1994). La teoría sostiene que los nuevos embriones están rodeados de un endosperma balanceado cuando el complemento genético que aporta la madre es el doble del que aporta el padre (relación 2:1). Como en la formación del endospermo la madre aporta dos núcleos haploides y el padre aporta uno, esta relación se cumple cuando ambos progenitores tienen igual EBN (que puede ser 1, 2 o 4). Dado que el EBN se modifica del mismo modo que la ploidía (por ejemplo, si se duplica una especie de complemento cromosómico $2n=2x$; 2EBN, pasa a $2n=4x$; 4EBN) y es el verdadero determinante del éxito del cruzamiento, lo han denominado la “ploidía efectiva” (Johnston *et al.* 1980). En el caso de *S.*

commersonii (1EBN) y *S. tuberosum* (4EBN) según la teoría del EBN deberían existir modificaciones en la ploidía en dos niveles para que el cruzamiento sea viable (si no existe ningún otro tipo de barrera en la hibridación).

Varios métodos han sido propuestos y utilizados para romper las barreras de incompatibilidad ocasionadas por los desbalances en el endosperma. Los más importantes han sido la manipulación de la ploidía, el rescate de embriones y la hibridación somática (Jansky, 2006). Dentro de la manipulación de la ploidía, la producción de gametos con el número cromosómico no reducido, fenómeno que ocurre en muchas especies de papa en forma natural (Watanabe y Peloquin, 1989), es uno de los mecanismos más sencillos de utilizar. Por tal motivo, rápidamente puede ser puesto en práctica por cualquier programa de mejoramiento.

1.5. OBJETIVOS

El presente trabajo se propone dos objetivos generales para los cuales se incluyen varios objetivos específicos:

Como primer objetivo general se pretende generar aportes al conocimiento de la resistencia genética de *S. commersonii* a la MB de la papa, utilizando un sistema de inoculación controlada en suelo.

Para esto se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- i) caracterizar genotipos de *S. commersonii* para resistencia a la raza 3 biovar 2 de *R. solanacearum* utilizando un método de inoculación en suelo bajo condiciones ambientales controladas.

- ii) determinar en qué medida la resistencia de *S. commersonii* es transmisible por vía sexual en un trasfondo genético susceptible.
- iii) determinar que relación existe entre los efectos del genotipo de *S. commersonii* y la cepa de *R. solanacearum* en la expresión de la enfermedad.

Como segundo objetivo general se pretende la introgresión de la resistencia a la Marchitez Bacteriana de *S. commersonii* en el mejoramiento genético de papa de Uruguay. Para esto, se planteó poner en práctica un esquema de introgresión de *S. commersonii* en el germoplasma de *S. tuberosum*, basado en cruzamientos sexuales dirigidos y la producción de gametos con el número cromosómico no reducido.

APORTES AL CONOCIMIENTO DE LA RESISTENCIA A LA MARCHITEZ
BACTERIANA DE LA PAPA EN *Solanum commersonii* Dun. BAJO
CONDICIONES DE INOCULACIÓN CONTROLADAS ¹

Resumen

Los niveles de resistencia a la marchitez bacteriana (MB) de la papa causada por *Ralstonia solanacearum* (Rs) son limitados. *Solanum commersonii* (cmm) es una especie silvestre destacada por su resistencia a MB. Los objetivos de este trabajo fueron (i) caracterizar genotipos de cmm para resistencia a Rs (raza 3, biovar 2) utilizando un método de inoculación en suelo, (ii) determinar en qué medida la resistencia de cmm es transmisible por vía sexual en un trasfondo genético susceptible, y (iii) determinar la relación entre un grupo de cepas de Rs raza 3 biovar 2 y genotipos de cmm en la expresión de la resistencia. Se utilizó una metodología de inoculación en suelo bajo condiciones de temperatura y luz controladas. Para genotipos de cmm colectados en distintas regiones de Uruguay, se encontró variabilidad en la resistencia a MB. Mediante el cruzamiento de dos genotipos de cmm con respuestas contrastantes a MB se obtuvo una progenie de 121 genotipos. La distribución de los niveles de resistencia en la progenie indicaría un control poligénico, aunque esta conclusión es preliminar, ya que se confirmó que uno de los parentales era triploide. Un ensayo factorial utilizando cinco cepas de Rs aisladas en Uruguay y cinco genotipos de cmm, reveló diferencias en la virulencia entre cepas. No se observó interacción entre genotipo y cepa, por lo que en las condiciones de este trabajo la resistencia no fue dependiente del aislamiento del patógeno.

Palabras clave: inoculación, *Ralstonia solanacearum*, *Solanum tuberosum*, resistencia a enfermedades.

¹ Este capítulo fue aceptado en *Agrociencia* (Uruguay) para ser publicado como "Resistencia a la marchitez bacteriana de la papa en *Solanum commersonii* Dun." M. González, G. A. Galván, M. I. Siri, A. Borges, F. Vilaró. Fue preparado en base a las normas de la revista.

CONTRIBUTIONS TO THE KNOWLEDGE OF POTATO'S BACTERIAL WILT
RESISTANCE IN *Solanum commersonii* Dun. UNDER CONTROLLED
INOCULATION.

Abstract

The levels of resistance to bacterial wilt (BW) caused by *Ralstonia solanacearum* (Rs) are limited. *Solanum commersonii* (cmm) is a wild tuber-bearing potato highlighted for its resistance to BW. This research aimed to (i) characterize cmm genotypes for resistance to Rs (race 3, biovar 2) using inoculation to the soil under controlled conditions, (ii) determine to what extent resistance in cmm is transmissible to a susceptible genetic background, and (iii) determine the relationships between a set of Rs strains (race 3, biovar 2) and cmm genotypes in the expression of resistance to BW. The screening was performed under controlled conditions of temperature and light. Accessions collected from different regions of Uruguay showed diversity for resistance to BW. Two cmm genotypes with contrasting responses to BW were crossed, and an offspring of 121 genotypes was obtained. The distribution of BW resistance levels in the progeny suggested a polygenetic control for BW resistance; though this conclusion is preliminary regarding that one of the cmm parents was triploid. A factorial experiment using five *R. solanacearum* strains isolated in Uruguay and five cmm clones showed differences in the virulence between strains. There was no interaction between plant genotype and bacterial isolate, and therefore, under the conditions of this research, BW resistance in cmm was not dependent on the isolate of the pathogen.

Key-words: screening, *Ralstonia solanacearum*, *Solanum tuberosum*, disease resistance.

2.1. INTRODUCCIÓN

La marchitez bacteriana (MB) causada por la bacteria *Ralstonia solanacearum* (Rs) es la segunda enfermedad en el mundo del cultivo de papa. Produce severas pérdidas en regiones con clima tropical y subtropical. La enfermedad también puede ocurrir en climas templados como son las regiones de altitud elevada en los trópicos (CIP, 2007). Afecta a 1,5 millones de hectáreas al año en más de 80 países, con pérdidas de US\$ 950 millones (Walker y Collion, 1998). Sus consecuencias se ven agravadas por la ausencia de tratamientos curativos efectivos. A su vez, la gran diversidad del patógeno y la falta de entendimiento de algunos de los mecanismos de su diseminación y patogenicidad han obstaculizado el desarrollo de medidas efectivas para su manejo (Saddler, 2005). En regiones donde el patógeno es endémico, solo medidas evasivas son viables para el control (Zimnoch-Guzowska *et al.*, 2005). En este contexto, la resistencia genética se vuelve una pieza clave a la hora de integrar una estrategia de control. Sin embargo, la generación y utilización de germoplasma de papa con niveles estables de resistencia al marchitamiento ha sido muy limitada.

La búsqueda de resistencia a MB comenzó en la década de 1960 en la Universidad de Wisconsin (EUA) con germoplasma de *S. phureja* proveniente de la Colección Central Colombiana (Schmiediche, 1988). A partir de entonces se han ido incorporando diferentes fuentes de resistencia (*S. chacoense*, *S. rephanifolium*, *S. sparsipilum*, *S. multidisectum*, entre otras) hasta llegar al germoplasma actualmente disponible en el Centro Internacional de la Papa (CIP, Lima, Perú) y en el EMBRAPA-CNPQ (Brasilia, Brasil). Este germoplasma tiene aceptable apariencia de tubérculo, a la vez que posee buena resistencia de campo al marchitamiento causado por la raza 3 y por la raza 3 + raza 1, con una respuesta igual o mejor que los testigos resistentes 'Molinera' (*S. phureja* de origen Peruano) y 'Cruza 148' (pedigrí desconocido de origen Mexicano)

(Priu *et al.*, 2005; Carlos Lopes, comunicación personal, junio de 2009). No obstante, la resistencia a la latencia de infección en tubérculos asintomáticos está ausente en este germoplasma (Priu *et al.*, 2005). Luego de este proceso se entendió oportuno comenzar a explorar nuevas fuentes de resistencia al marchitamiento que mejoren a las actualmente disponibles y aporten estabilidad a la característica. Estas nuevas fuentes de resistencia, además, permitirían continuar con la búsqueda de la resistencia a la latencia de la bacteria en tubérculos asintomáticos.

Solanum commersonii Dun. (cmm) (Hawkes, 1990) es una especie silvestre diploide que ha sido destacada desde décadas atrás por su alta potencialidad para el mejoramiento de papa debido a su resistencia al frío y a sequías (Reddick, 1930; Palta y Simon, 1993; Chen *et al.*, 1999; Carputo *et al.* 2007). Entre los factores bióticos, además de resistencias a enfermedades causadas por virus y hongos, se destaca precisamente su alta resistencia a MB (Laferriere *et al.* 1999; Kim-Lee *et al.* 2004; Galván *et al.* 2006; Carputo *et al.* 2009; Siri *et al.*, 2009).

Los trabajos de Laferriere *et al.* (1999) y Carputo *et al.* (2009) reportaron resistencia en cmm para la raza 3 biovar 2 de Rs. Sin embargo, ambos estudios son limitados ya que en cada caso se utilizó un genotipo de cmm y una única cepa. Kim-Lee *et al.* (2004) evaluaron cuatro genotipos diferentes de la misma entrada de cmm (PI320266) para diferentes cepas de la raza 1 y 3. Estos autores reportaron diversidad en el nivel de resistencia entre los genotipos analizados, confirmando por primera vez la variabilidad existente para la característica dentro de la especie, y la necesidad de contar con germoplasma caracterizado para comenzar trabajos de mejoramiento genético.

Los primeros trabajos abarcativos de caracterización de germoplasma de cmm por resistencia a la raza 3 biovar 2 fueron reportados por Galván *et al.* (2006) y Siri *et al.* (2009). Siri *et al.* (2009) caracterizaron 30 genotipos de

diferentes orígenes geográficos de Uruguay para una cepa de la raza 3 biovar 2. El método de inoculación utilizado, basado en heridas en la parte aérea de la planta, no representa el proceso natural de infección. En efecto, este método presenta como limitante que algunos mecanismos activos de defensa de la planta son evadidos, dado que la bacteria es un patógeno de suelo e ingresa a la planta por heridas en las raíces. Por lo tanto, adaptar un método de inoculación de Rs bajo condiciones controladas y que sea representativo del proceso natural de infección en raíces sería de gran utilidad para caracterizar germoplasma de cmm, y así comenzar programas de pre-mejoramiento por resistencia a MB. Pese a lo agresivo del método de inoculación, varios de los materiales analizados por Galván *et al.* (2006) y Siri *et al.* (2009) exhibieron ausencia de síntomas por lo cual en dichos trabajos se planteó como hipótesis la presencia de altos niveles de resistencia en el germoplasma de cmm de Uruguay.

Una efectiva utilización de la resistencia a MB identificada, se ve limitada por el escaso conocimiento de la base genética de dicha característica. Esta información sería útil para encarar estrategias de cruzamientos que permitan ser eficientes en la incorporación de la resistencia en germoplasma susceptible. Probablemente *S. phureja* sea la fuente de resistencia más estudiada. En trabajos realizados con poblaciones segregantes de varios genotipos inoculados con una cepa de la raza 1, se sugirió la acción de tres genes dominantes e independientes con un posible efecto de otros genes modificadores (Rowe y Sequeira, 1970). Posteriormente, se propuso en esta especie la presencia de resistencia de tipo cepa específica para la raza 1 y para la raza 3, y pérdida de efectividad de la resistencia asociada a temperaturas altas (French y De Lindo, 1982; Tung *et al.*, 1990a). En particular estos trabajos señalaron como principal dificultad en el análisis de los datos la fuerte

variabilidad en el fenotipo de resistencia provocada por el ambiente, en especial por la temperatura y la luz.

Por otro lado, algunos trabajos incorporaron otras fuentes de resistencia aportadas por el clon “Cruza 148”, de origen mexicano y pedigrí desconocido, y por “AVRDC-1287.19”, de origen taiwanés y producto del cruzamiento entre *S. chacoense* y *S. raphanifolium* (Schmiediche, 1988). Estos trabajos resultaron en una resistencia parcial para determinada cepa de la raza 1 y muy estrechamente relacionada a la adaptación ambiental, sobre todo a temperaturas elevadas, lo que estaría relacionado a una resistencia de herencia compleja y poligénica (Tung *et al.*, 1990b). En estudios posteriores, los mismos autores detectaron una fuerte interacción planta-patógeno-ambiente. Los cambios de agresividad de las diferentes cepas utilizadas, debido a cambios de temperatura, fueron la principal fuente de inestabilidad en estos experimentos (Tung *et al.*, 1990a).

En cmm algunos trabajos exploratorios realizados por Galván *et al.* (2006) y Siri *et al.* (2009) muestran que, ante un método agresivo de inoculación en suelo y planta, algunas accesiones se comportaron como asintomáticas. Determinar en qué medida esta resistencia es transmisible por vía sexual en un trasfondo genético susceptible puede aportar información interesante sobre la base genética de la característica.

La raza 3 biovar 2 de *R. solanacearum* cuenta con muy poca variabilidad genética (Fregan y Prior, 2005), resultado que fue confirmado por Siri *et al.* (2008) para cepas de Uruguay usando marcadores moleculares específicos. No obstante, se han observado cepas con mayor virulencia (mayor proporción de plantas muertas) cuando se compararon los resultados de infección utilizando un único genotipo hospedero (M.I. Siri, 2010, com. pers.). Determinar si hay diferencias en la virulencia y/o si se expresa en la planta una resistencia de tipo cepa-específica, facilitaría la elección pertinente de la cepa a utilizar en la

inoculación a la hora de tamizar genotipos cmm para resistencia a MB. Por otro lado, se generaría mayor información sobre la posible base genética de la resistencia.

Los objetivos de este trabajo fueron (i) caracterizar diferentes genotipos de cmm para resistencia a la raza 3 biovar 2 del patógeno utilizando un método de inoculación en suelo bajo condiciones ambientales controladas, (ii) determinar en qué medida la resistencia de cmm es transmisible por vía sexual en un trasfondo genético susceptible, y (iii) determinar que relación existe entre los efectos del genotipo de cmm y la cepa de Rs raza 3 biovar 2 en la expresión de la MB.

2.2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1. Material vegetal

Para la caracterización de la resistencia en diferentes genotipos de cmm, se evaluaron 32 clones diferentes provenientes de distintas regiones de Uruguay. Se incluyeron además dos clones de *S. phureja* (phu) (192 y 195) seleccionados a partir de cruzamientos del proyecto de mejoramiento genético de papa del INIA (Uruguay), y el cultivar de *S. tuberosum* (tbr) 'Chieftain' como testigo susceptible. En la primera caracterización de la resistencia, los clones de cmm 05.02.6 y 04.204.3 fueron seleccionados como parentales de la progenie dada la resistencia y susceptibilidad que mostraron respectivamente. Los clones de cmm F97, F102, F118, 05.02.6 y 04.204.3 y el cultivar 'Chieftain' fueron seleccionados por sus diferentes niveles de resistencia en la caracterización de la progenie para realizar el ensayo de interacción entre genotipo y cepa. Todo el material para la evaluación se obtuvo del banco de germoplasma activo *in vitro*

del Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA), Estación Experimental Wilson Ferreira Aldunate.

2.2.2 Cruzamientos

Para realizar el cruzamiento, los genotipos de cmm 05.02.6 y 04.203.4 fueron trasplantados en macetas de 250 mL por 15 días para lograr su aclimatación. Luego fueron pasados a macetas de 5 L para generar un adecuado desarrollo de planta y posibilitar el cruzamiento. Este se realizó dentro de un invernadero de vidrio con condiciones de temperatura (25°C) y fotoperíodo controlado (14 horas de luz). La floración ocurrió a los 52 días post trasplante. Se utilizó polen fresco de flores abiertas de las plantas utilizadas como progenitor masculino (genotipo 04.204.3) para realizar la polinización sobre flores emasculadas de las plantas utilizadas como hembra (genotipo 05.02.6). A los 50 días de la polinización se cosecharon las bayas. Las semillas extraídas se trataron mediante inmersión durante 24 horas en una solución de 1500 ppm de ácido giberélico con el fin de romper el período de dormición. Luego se sembraron *in vitro* en medio de Murashige y Skoog (MS) (Murashige y Skoog, 1962) con el fin de conservar el material vegetal para evaluaciones y utilización en mejoramiento. Se obtuvieron 145 individuos de la progenie que fueron denominados con la letra F (F1 al F145).

2.2.3. Cepas de *R. solanacearum* y condiciones de cultivo

La cepa utilizada en la caracterización de accesiones de cmm fue UY036. La cepa utilizada para la caracterización de la progenie producto del cruzamiento entre los genotipos de cmm 05.02.6 y 04.203.4 fue UY043. Las cepas utilizadas en el experimento de interacción genotipo por cepa fueron UY031, UY035, UY036, UY041 y UY043. Todas las cepas utilizadas pertenecen

a la raza 3 biovar 2A del patógeno (Filotipo II/secuevar 1-2) y colectadas en diferentes cultivos de papa comercial infectados en Uruguay (Siri *et al.*, 2004). Las cepas se conservan a -70°C en la Cátedra de Microbiología de la Facultad de Química, Universidad de la República. Previo a su uso fueron re-aisladas de tubérculos de papa infectados para asegurarse la recuperación del fenotipo de virulencia.

2.2.4. Evaluación de la resistencia al marchitamiento bacteriano

Se utilizó una metodología de inoculación en suelo que permite diferenciar grados de resistencia a MB en plántulas provenientes de multiplicación *in vitro*, basada en Montanelli *et al.* (1995). El inóculo se preparó siguiendo la metodología empleada por Thurston y Lozano (1968) como una suspensión de bacterias en suero fisiológico, a una concentración de 1×10^8 ufc·mL⁻¹. Se partió de colonias incubadas en placas de Petri durante 48 horas a 28°C en medio de crecimiento Kelman conteniendo cloruro de 2,3,5-trifenil tetrazolio (TTC). La concentración del inóculo se estimó mediante lecturas de absorbancia de 0.1 en espectrofotómetro (OD 550 nm), y se corroboró mediante la siembra de diluciones a 1×10^5 y 1×10^6 en placas de Petri con medio TTC y el conteo directo de las colonias. Para las evaluaciones de resistencia se utilizaron plántulas con 5-8 hojas expandidas. En todos los experimentos, las plántulas utilizadas derivaban de la micropropagación *in vitro* a los efectos de asegurar la homogeneidad de desarrollo de plántulas y la obtención de replicas (somaclones) de cada genotipo. Para ello, segmentos de tallo con un nudo (yema) fueron cultivados en frascos con medio MS por tres semanas, seguido de dos semanas de aclimatación en invernadero en el recipiente a usarse en la inoculación. El recipiente consistió de celdas individuales para cada plántula de 17 cm³, con 4 g de sustrato hortícola comercial libre de patógenos. En el ensayo de caracterización de resistencia en la colección de cmm se utilizaron

12 repeticiones (plántulas) por cada genotipo mientras que en todos los demás ensayos de inoculación realizados se utilizaron 26 repeticiones para cada genotipo, a excepción de algunos individuos de la progenie que presentaron menor tasa de multiplicación in-vitro. En todos los experimentos se inocularon tres plántulas con suero fisiológico sin bacterias como control negativo.

Para la inoculación, primeramente se generó un orificio en el sustrato con una punta plástica de micropipeta, con el fin de generar heridas a nivel radicular. El orificio de alrededor de 1 cm de profundidad, se realizó a 0,5 cm del tallo principal. Seguidamente, en cada orificio se aplicó 1 mL de la suspensión bacteriana utilizando una pipeta. Después de la inoculación, las plantas se mantuvieron en una cámara con luz artificial (12 horas de luz, $78 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) y 28°C constante medido a nivel radicular. Asumiendo que las condiciones ambientales no variaban en el espacio no se aleatorizaron las posiciones de las repeticiones de cada genotipo dentro de la cámara. Se realizaron riegos diarios para mantener húmedo el sustrato, sin provocar excesos de agua. La evaluación de síntomas se hizo en forma visual a los 28 días posteriores a la inoculación (dpi). A cada una de las plantas de cada genotipo se le asignó un valor de “0” correspondiente a las plantas sin síntomas, o “1” a las plantas con síntomas.

En total se realizaron tres ensayos independientes de inoculación: i) evaluación de una colección de 32 genotipos de cmm utilizando la cepa UY036; ii) evaluación de la progenie F1 de 122 genotipos obtenida a partir del cruzamientos entre los genotipos de cmm 05.02.6 y 04.203.4 utilizando la cepa UY043, y iii) evaluación de la interacción genotipo de cmm x cepa de Rs en el cual se utilizaron los genotipos de cmm F97, F102, F118, (seleccionados por sus diferentes niveles de resistencia en la caracterización de la progenie), los progenitores 05.02.6 y 04.204.3 y las cepas: UY031, UY035, UY036, UY041 y UY043 de *R. solanacearum*.

2.2.5. Análisis de los datos

Para el ajuste del método de determinación del nivel de resistencia en los diferentes genotipos, se registró la proporción de plantas marchitas a los 7, 11, 19, 22 y 28 días posteriores a la inoculación (dpi) sobre el total de plantas inoculadas de cada genotipo. De acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo, se selecciono la lectura a los 28 dpi para asignar el nivel de resistencia.

Para determinar el grado de resistencia en los diferentes genotipos de cmm se calculó la proporción de plantas marchitas sobre el total de 12 plantas inoculadas. Luego se asigno una reacción a la enfermedad según el siguiente criterio arbitrario: R= resistente (0,00-0,25), MR= medianamente resistente (0,26-0,50), MS= medianamente susceptible (0,51-0,75) y S= susceptible (0,76-1,00).

Para comparar los valores de resistencia de los genotipos de la progenie e identificar diferencias significativas entre estos, se utilizó un Modelo Lineal Generalizado asumiéndose distribución binomial de la variable P (proporción de plantas enfermas de cada genotipo) (McCullagh and Nelder, 1989). Se ingresaron en el análisis solamente los tratamientos (genotipos) que tenían entre 20 y 26 plantas inoculadas, totalizando una población de 124 genotipos (121 genotipos de la progenie, los dos padres y el testigo susceptible 'Chieftain'). Fueron analizados por fuera de este método los genotipos asintomáticos para todas sus repeticiones (completamente resistentes), ya que por su condición no presentaron individuos con síntomas y por lo tanto la estimación de la varianza para la variable P fue igual a cero. Para la comparación se calculó el intervalo de confianza (95% de confianza) partiendo de la proporción de plantas enfermas estimada. Para visualizar las diferencias entre genotipos de la progenie se realizó un análisis de conglomerados. La matriz de distancia fue elaborada utilizando las diferencias entre las

proporciones de plantas enfermas estimadas de cada genotipo. Se usó el método de agrupamiento de Ward y se utilizó como criterio de corte para determinar el número de grupos el índice pseudo F y pseudo t^2 .

Para determinar si existe interacción para la resistencia a MB entre diferentes genotipos y diferentes cepas se utilizaron cinco genotipos de cmm diferentes (F97, F102, F118, 04.203.4, 05.02.6) el control susceptible 'Chieftain' y cinco cepas de la raza 3 biovar 2 provenientes de Uruguay (UY031, UY035, UY036, UY041 y UY043). Se utilizó un diseño experimental con arreglo factorial de los tratamientos (6 x 5), inoculando 26 plantas para cada una de las 30 combinaciones entre genotipos y cepas. Cada tratamiento fue inoculado y analizado de la misma forma que para la comparación de niveles de resistencia en la progenie. Se analizaron los efectos de las diferentes fuentes de variación (genotipo, cepa, genotipo x cepa) utilizando un Modelo Lineal Generalizado y asumiéndose distribución binomial de la variable P (proporción de plantas enfermas de cada genotipo). La significancia de los efectos se probó mediante una prueba F que se origina del cociente de dos chi-cuadrados que surgen de la devianza del modelo y la devianza residual.

2.3. RESULTADOS

2.3.1. Evaluación de la resistencia al marchitamiento bacteriano en diferentes genotipos de *S. commersonii* colectados en Uruguay

La evaluación de resistencia a MB en 32 clones de cmm utilizando la cepa UY036 de Rs mostró amplia variabilidad en los niveles asignados (Cuadro 1). El 25% de los genotipos de cmm fueron R (P entre 0,00-0,25), 19% MR (P entre 0,26-0,50), 50% MS (P entre 0,51-0,75) y 6% S (P entre 0,75-1,00). El testigo susceptible 'Chieftain' de tbr mostró una proporción de plantas enfermas

de 0,83. Los genotipos de phu 192 y 195 tuvieron un comportamiento intermedio y susceptible respectivamente. En la Figura 1 se presenta la evolución de los síntomas en el tiempo de siete genotipos representativos de diferentes respuestas a la enfermedad. Los genotipos de cmm 05026 (R) y 04203.4 (MS) fueron seleccionados por sus niveles de resistencia y por presentar características fenotípicas similares.

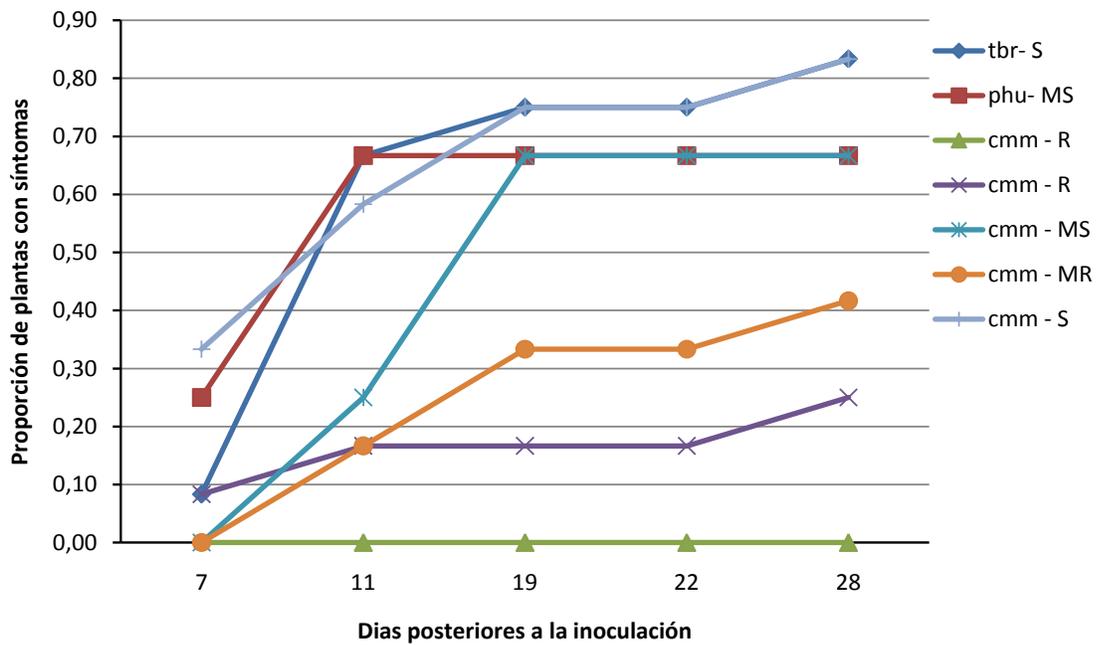


Figura 1. Evolución en el tiempo de la proporción de plantas con síntomas de marchitamiento para cinco genotipos de *S. commersonii*, un clon de 192 de *S. phureja* (192) y el testigo susceptible cv. 'Chieftain' de *S. tuberosum* ssp. *tuberosum* en una ensayo de inoculación con la cepa UY036 de la raza3 biovar 2 de *R. solanacearum*.

Cuadro 1. Proporción de plantas con marchitamiento a los 28 días posteriores a la inoculación con la cepa UY036 de la raza 3 biovar 2 de *R. solanacearum* en 32 accesiones de *S. commersonii* colectadas en Uruguay. Se incluyen dos genotipos de *S. phureja* (192 y 195) y un genotipo de *S. tuberosum* ssp. *tuberosum* cv 'Chieftain' incluido como control susceptible.

Individuo	Origen	p 28 dpi ¹	RE ²	Individuo	Origen	p 28 dpi ¹	RE ²
0409T	Rio Negro	0,00	R	06012	Canelones	0,58	MS
05026	Canelones	0,00	R	04203.4	INIA ²	0,63	MS
04204.3	INIA	0,11	R	10093	Salto	0,67	MS
09023	Paysandú	0,11	R	10167	Paysandú	0,67	MS
20176	desconocido	0,17	R	050524	Canelones	0,67	MS
090211	Paysandú	0,25	R	505212	Canelones	0,67	MS
0505218	Canelones	0,25	R	05016	Canelones	0,75	MS
0102TA	Soriano	0,25	R	050526	Canelones	0,75	MS
100118	Paysandú	0,33	MR	10177	Salto	0,75	MS
10085	Artigas	0,33	MR	10176	Salto	0,75	MS
050525	Canelones	0,42	MR	09028	Paysandú	0,75	MS
09027	Paysandú	0,42	MR	0701A10	Maldonado	0,75	MS
03037	Canelones	0,42	MR	04023	Colonia	0,75	MS
0505216	Canelones	0,50	MR	Chieftain ⁴	USA	0,83	S
192 ³	INIA	0,50	MR	10073	Artigas	0,83	S
050527	Canelones	0,58	MS	10086	Artigas	0,83	S
11013	Canelones	0,58	MS	195 ³	INIA	0,85	S
09024	Paysandú	0,58	MS				

¹ Proporción de plantas enfermas a los 28 días posteriores a la inoculación.

² Respuesta a la enfermedad: R= resistente (0-0,25), MR= medianamente resistente (0,26-0,50), MS= medianamente susceptible (0,51-0,75) y S= susceptible (0,76-1).

³ *Solanum phureja*. Clones provenientes del programa de mejoramiento genético de INIA.

⁴ *Solanum tuberosum* subsp *tuberosum*. Cultivar comercial.

Cuadro 2. Eficiencia en los cruzamientos entre el genotipo de *S. commersonii* 0502.6 (R) y el genotipo 04203.4 (MS).

Flores polinizadas	Bayas obtenidas	Semillas cosechadas	Semillas germinadas	Cuajado (%)	Semillas/baya	Germinación (%)
91	55	313	152	0,61	5,64	0,49

2.3.2. Cruzamiento entre genotipos R y MS de *S. commersonii* y obtención de una progenie F1

El Cuadro 2 muestra los resultados obtenidos en el cruzamiento entre el genotipo 05.02.6 (R) y el genotipo 04203.4 (MS).

El genotipo 0502.6 fue usado como hembra dado su bajo porcentaje de polen fértil (11 %) estimado mediante una técnica de tinción. Del mismo modo se observó bajo número de semillas obtenidas por baya (5,64) comparado con otros cruzamientos entre genotipos de esta especie. Esto indica baja fertilidad como hembra del genotipo 05.02.6 o alguna condición de incompatibilidad entre ambos parentales utilizados.

2.3.3. Distribución de niveles de resistencia dentro de la progenie

El carácter de resistencia a MB medido como proporción de plantas con marchitamiento presento un comportamiento gradual en la progenie F1 (05.02.6 x 04203.4) con un valor P promedio de 0,19 y un rango desde P=0,77 (alta susceptibilidad) hasta P=0,00 (plantas asintomáticas) (Figura 2). La comparación de los intervalos de confianza asignados a las medias estimadas en cada genotipo (habiendo excluido los 13 genotipos asintomáticos que presentaron por tanto varianza cero) mostraron que únicamente los genotipos más resistentes y los más susceptibles difirieron significativamente (Figura 3).

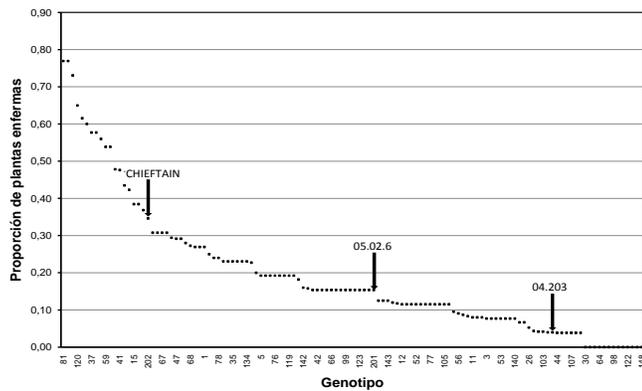


Figura 2. Proporción de plantas con marchitamiento en cada uno de los 134 genotipos de *S. commersonii* de la progenie F1 (05.02.6 x 04.203.4) inoculados con la cepa UY043 de la raza 3 biovar 2 de *R. solanacearum*. Únicamente se indican el nombre de algunos genotipos cmm e el eje horizontal. Los parentales y el testigo susceptible cultivar 'Chieftain' son marcados con flechas.

De acuerdo a este análisis, no se encontraron diferencias significativas entre la mayor parte de los genotipos de la progenie F1, los progenitores y el testigo susceptible 'Chieftain'. En consecuencia, en este experimento en el cual se utilizó la cepa UY043, no se confirmó el contraste originalmente observado entre los padres de la progenie cuando fueron inoculados con la cepa UY036. El 76 % de los genotipos (92 de 121) presentaron una proporción de plantas enfermas estimada menor a 0,25. Solo el 9% de la progenie (11 genotipos de

de 121) presentó un nivel de susceptibilidad que superó la proporción de plantas enfermas de 0,5. El testigo susceptible ‘Chieftain’ presentó bajo número de plantas enfermas ($P=0,35$) con respecto al ensayo anterior ($P=0,83$), cuando se había utilizado la cepa UY036.

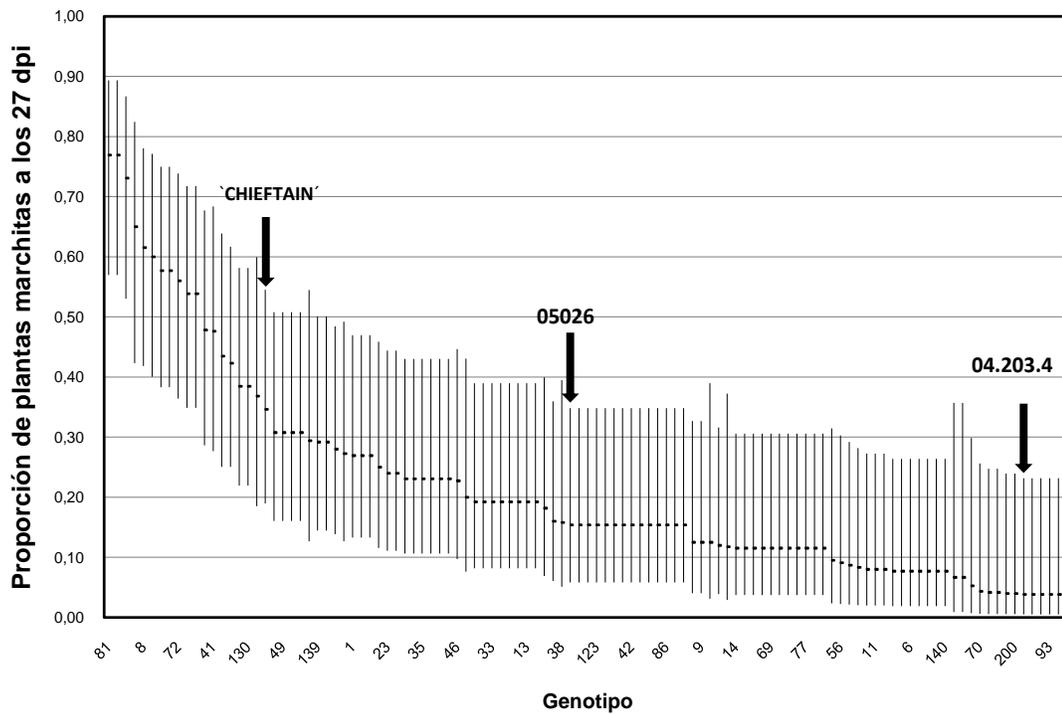


Figura 3. Proporción de plantas marchitas (P) e intervalo de confianza para cada genotipo de la progenie F1 cmm (05026 x 04.203.4) a los 28 días posteriores a la inoculación. Las flechas marcan la posición de los padres de la familia y el testigo susceptible *S. tuberosum* ssp. *tuberosum* cv. ‘Chieftain’. El eje horizontal presenta solamente algunos números de identificación. Se excluyeron del análisis 13 genotipos cuya proporción de plantas enfermas fue nula ($P=0$), ya que su varianza esimada es cero y no pueden ser comparados estadísticamente.

Como otra forma de observar estos resultados, se realizó un análisis de conglomerado utilizando como medida de distancia las diferencias entre las proporciones estimadas de plantas enfermas de cada uno de los genotipos que participaron del análisis estadístico (Figura 4). El objetivo fue obtener agrupamientos de los genotipos de acuerdo a la similitud de niveles de resistencia.

Los dos criterios de corte utilizados coincidieron en la formación de tres grupos de genotipos. El Cuadro 3 muestra el número de individuos que integraron cada uno de los tres grupos, así como los valores máximos, mínimos y promedios de la proporción de plantas enfermas en los genotipos de cada grupo. El “grupo 1” incluye a los 11 individuos con mayor nivel de susceptibilidad. El testigo susceptible ‘Chieftain’ integró el “grupo 2” que incluyó a 30 de 111 genotipos analizados. Por último, los dos genotipos parentales de la familia integraron el “grupo 3”, que fue el más numeroso (70/111) y comprende los genotipos con mayor nivel de resistencia dentro de los incluidos en el análisis.

Cuadro 3. Proporción de plantas marchitas mínima, máxima, promedio y número de genotipos dentro de cada grupo conformado en el análisis de conglomerados. Fueron evaluados 111 genotipos F1 provenientes del cruce entre los parentales de cmm 05.02.6 y 04203.4.

Grupos	Número de genotipos	Proporción de plantas enfermas		
		Mínima	Máxima	Promedio
1	11	0,54	0,77	0,63
2	30	0,23	0,48	0,30
3	70	0,04	0,20	0,11

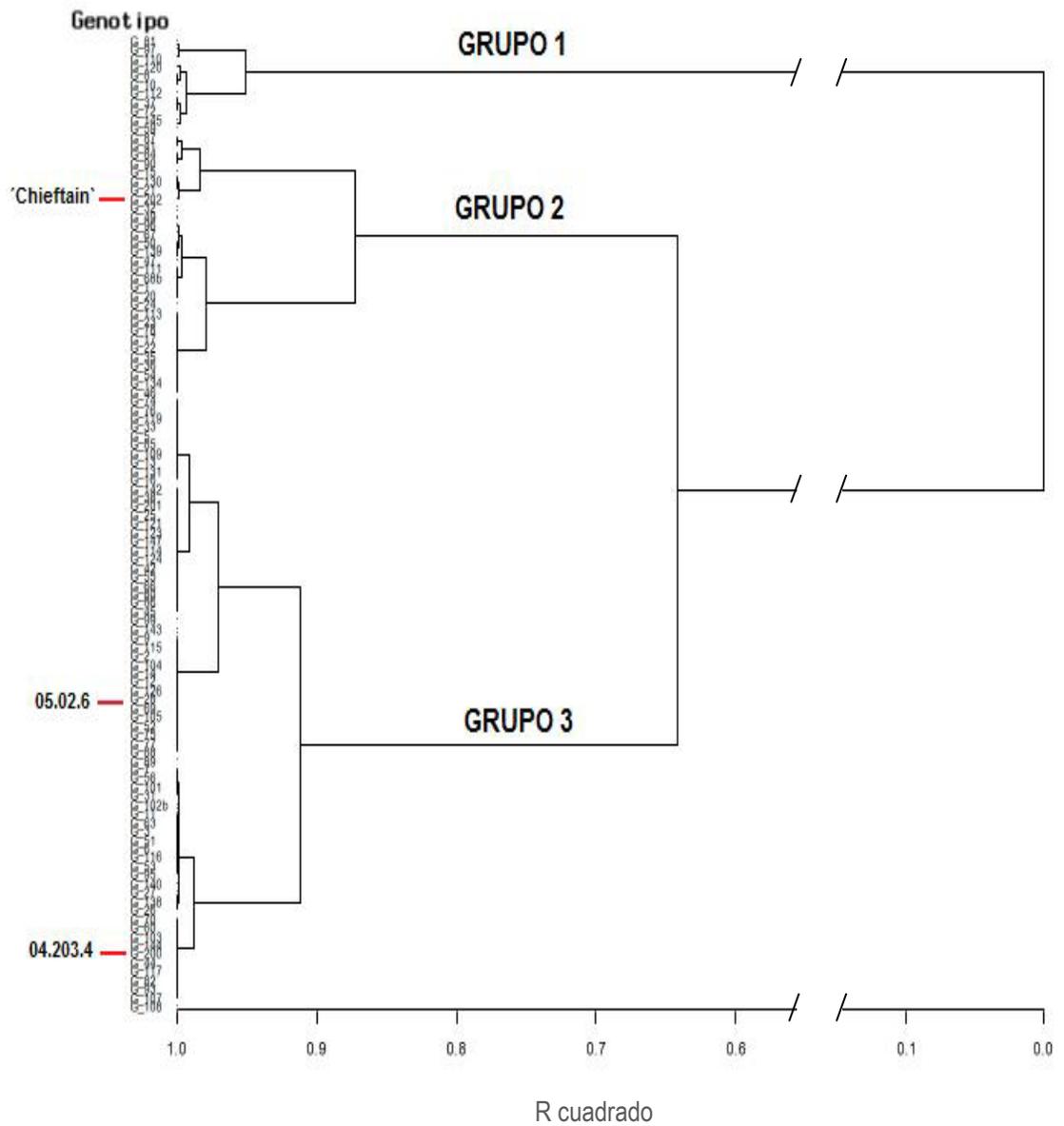


Figura 4. Análisis de conglomerado por método e Ward, utilizando como medida de distancia las diferencias entre las proporciones de plantas enfermas estimadas de cada uno de los genotipos que participaron del análisis estadístico. Se identificaron los grupos utilizando el índice pseudo F y pseudo T.

2.3.4 Interacción genotipo por cepa

A los efectos de investigar si la resistencia a MB observada en la progenie F1 es de tipo cepa específica, se diseñó un experimento factorial en el cual se incluyeron tres genotipos cmm de la F1 (representativos de diferentes niveles de resistencia), los progenitores de la F1 de cmm 05.02.6 y 04203.4 y el cultivar 'Chieftian' como testigo susceptible, que fueron inoculados con cinco cepas de Rs (UY031, UY035, UY036, UY041 y UY043) pertenecientes a la raza 3 biovar 2. El Cuadro 4 presenta la proporción de plantas con síntomas de MB para cada uno de estos seis genotipos con sus respectivos intervalos de confianza.

Cuadro 4. Proporción de plantas enfermas estimada e intervalo de confianza (95% de probabilidad) para los genotipos utilizados en el experimento de interacción genotipo por cepa. Datos obtenidos de la inoculación de la población segregante con la cepa UY043.

Genotipo	P est. ¹	LS_95_p ²	LI_95_p ³
F97	0,769	0,893	0,570
Chieftain	0,346	0,545	0,190
05.02.6	0,154	0,348	0,058
F102	0,080	0,273	0,020
04203.4	0,040	0,239	0,005
F118	0,000	0,000	0,000

¹ Proporción de plantas enfermas estimada.

² Límite superior del intervalo de confianza (95% de probabilidad).

³ Límite inferior del intervalo de confianza (95% de probabilidad).

Cuadro 5. Efecto de las diferentes fuentes de variación para el experimento de interacción genotipo por cepa.

Fuente de variación	Grados de Libertad	Valor F ¹	Pr > F ²
genotipo	5	27,08	<0,0001
cepa	4	9,09	<0,0001
genotipo*cepa	20	1,03	0,4586

¹ Valor F obtenido del cociente de dos chi-cuadrados que surgen de las devianzas.

² Probabilidad de error de tipo 1 para el valor de F hallado.

El Cuadro 5 muestra los efectos de las diferentes fuentes de variación para el experimento. Los efectos del genotipo y la cepa fueron significativos, mientras que la interacción genotipo x cepa no fue significativa ($\alpha=0,05$). Por tanto, se encontraron diferencias significativas en el nivel de resistencia entre los genotipos, y diferencias significativas en el nivel de virulencia de las cepas, pero no se detectaron respuestas cepa específica significativas. La respuesta de resistencia o susceptibilidad no estuvo afectada por el tipo de cepa.

La Figura 5 presenta la respuesta de los genotipos a las diferentes cepas de Rs. Los cambios aparentes en el ordenamiento que se observan no fueron significativos estadísticamente, y se puede afirmar que el ordenamiento de la respuesta a la enfermedad entre genotipos se mantuvo para cada cepa utilizada ($\alpha=0,05$). El cultivar de tbr 'Chieftain' fue el más susceptible para todas las cepas utilizadas (Cuadro 6). Los genotipos de cmm elegidos por sus diferentes niveles de resistencia mantuvieron esa condición para todas las cepas utilizadas. El genotipo F102 y los genotipos parentales de la familia 05.02.6 y 04.203.4 tuvieron una respuesta intermedia, y no fueron discriminados entre sí por ninguna de las cepas. La cepa UY043 fue la única que en promedio obtuvo

menos muertes de planta para todos los genotipos (menor virulencia). La Figura 5 muestra que esta cepa, utilizada para caracterizar la progenie entre los genotipos 05.02.6 y 04.203.4, es la única que no tuvo poder de discriminar entre los genotipos más resistentes y aquellos con resistencia intermedia (por ejemplo, los genotipos F118 y F102).

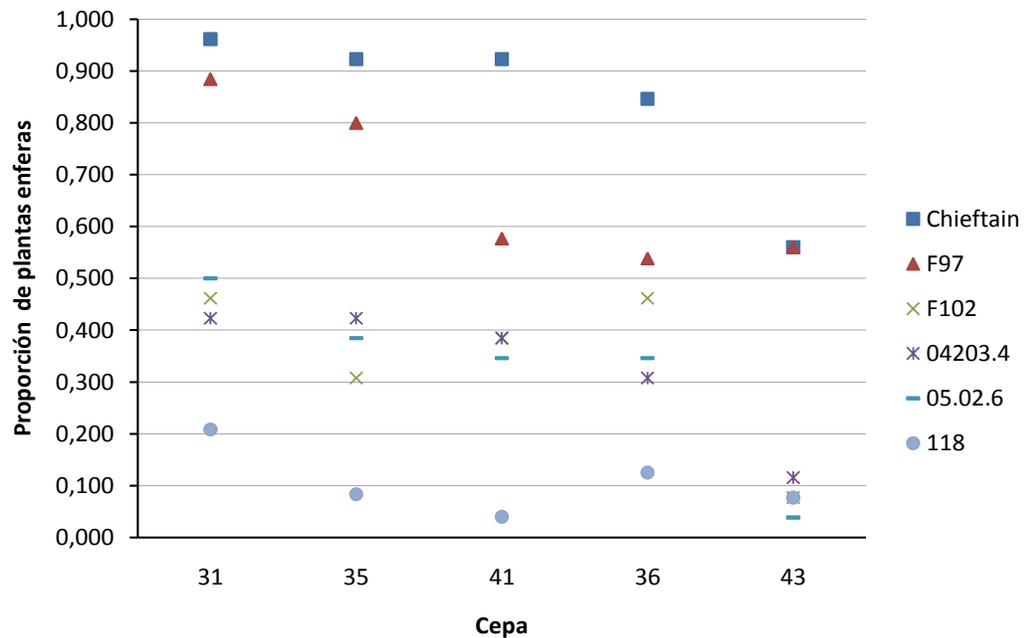


Figura 5. Comportamiento de los diferentes genotipos inoculados con cinco cepas de *Ralstonia solanacearum* aisladas en Uruguay, en el experimento de interacción genotipo por cepa. Las diferencias en el ordenamiento de los genotipos con las diferentes cepas de *R. solanacearum* utilizadas no fueron significativas. Las cepas más agresivas tuvieron mayor poder de discriminación de genotipos, separando mejor los extremos contrastantes de las categorías intermedias.

Cuadro 6. Proporción de plantas enfermas a los 28 días post inoculación para los diferentes genotipos elegidos y las diferentes cepas utilizadas en el experimento de interacción genotipo por cepa.

Genotipo	Cepa					Efecto medio del genotipo*
	31	35	36	41	43	
'Chieftain'	0,96	0,92	0,85	0,92	0,56	0,88 a
F97	0,88	0,80	0,54	0,58	0,58	0,70 b
F102	0,46	0,31	0,46	0,38	0,08	0,31 c
04203.4	0,42	0,42	0,31	0,38	0,12	0,31 c
05.02.6	0,50	0,38	0,35	0,35	0,04	0,27 cd
F118	0,21	0,08	0,13	0,04	0,08	0,09 d
Efecto medio de la cepa *	0,64 a	0,50 a	0,43 a	0,42 a	0,17 b	

* Las medias seguidas por la misma letra no difieren significativamente ($\alpha=0,05$).

2.4. DISCUSIÓN

La MB es una de las enfermedades más importantes del cultivo de papa. Al igual que para otras enfermedades bacterianas, la resistencia genética es un factor clave en su manejo integrado. En zonas donde la enfermedad es esporádica o el patógeno cuarentenario, es difícil realizar ensayos a campo con la enfermedad debido a los riesgos de diseminación y la imposibilidad de erradicación posterior. Por tal motivo, disponer de un método de evaluación de la resistencia bajo condiciones controladas y que logre representar la interacción planta-patógeno natural permite realizar ensayos que aporten al mejoramiento genético para resistencia sin poner en riesgo al sector productivo de la región. En este caso, el método de inoculación en suelo ajustado para

este trabajo permitió explorar una colección de genotipos de cmm como nueva fuente de resistencia a la MB de la papa.

Con este método, y como era de esperar, el cultivar 'Chieftain' de tbr presentó altos niveles de susceptibilidad a MB (Cuadro 1). Por otro lado, la evaluación de la respuesta de diferentes clones de cmm reveló variación en los niveles de resistencia, desde individuos con resistencia extrema (asintomáticos) hasta individuos con niveles de susceptibilidad similares al cultivar 'Chieftain'. Los niveles de resistencia fueron mayores que los obtenidos por Montanelli *et al.* (1995), quienes aplicaron un método de inoculación similar para otros genotipos de cmm. En ese trabajo, el cultivar 'Cruza 148' y el cultivar de *S. phureja* 'BR-63.65' ('Molinera'), conocidos por su buena resistencia a campo, fueron los de mejor comportamiento y aun así presentaron varias plantas con síntomas. Por lo tanto, la resistencia en algunos individuos de cmm se considera muy alta bajo estas condiciones de inoculación. Los resultados confirman los altos niveles de resistencia encontrados para la especie por Laferriere *et al.* (1999), Kim-Lee *et al.* (2004), Galván *et al.* (2006), Carputo *et al.* (2009) y Siri *et al.* (2009). Por otro lado, evidencia la necesidad de realizar tamizados dentro de la especie dada la alta variabilidad encontrada en la característica. Hasta dónde conocemos, esta es la primera vez que se caracterizan diferentes genotipos de cmm para resistencia a MB con un método de inoculación en suelo. Los materiales más resistentes podrían utilizarse para realizar estudios de resistencia a la infección latente de la bacteria en tubérculos asintomáticos.

Debido a la baja eficiencia obtenida en el cruzamiento realizado entre los progenitores seleccionados para formar la progenie en estudio (Cuadro 2), se estudió la ploidía de los progenitores por citometría de flujo. El trabajo se realizó comparando el contenido C de ADN genómico con un diploide conocido de

cmm (genotipo 04.02.3). Se confirmó que el genotipo 05.02.6 tiene un 50% más de genoma que el testigo diploide, y el genotipo 04.203.4 la misma cantidad que el testigo diploide. Por lo tanto se postuló que el progenitor femenino 05.02.6 sería triploide y el progenitor masculino 04.203.4 sería diploide (F. Santiñaque, 2009, com. pers.). Este dato debería confirmarse mediante el conteo del número de cromosomas en células somáticas. La presencia natural de citotipos triploides de cmm fue descrita por Correll (1962) y por Tam y Hawkes (1986). La utilización de un genotipo triploide como parental dificulta los análisis de distribución de niveles de resistencia dentro de la progenie generada, ya que la producción de gametos es diferente a la esperable para un diploide. En un triploide, la mayoría de los gametos son no funcionales por aneuploidías producidas en la meiosis (Ramsey y Schemske, 1998). Esto tiene relación con la baja fertilidad presentada en estos genotipos. Sin embargo, además de algunos gametos aneuploides, son esperables proporciones bajas de gametos euploides que pueden ser $n=x$, $n=2x$ y $n=3x$. A su vez, no conocemos cuales de estos gametos aportarán el complemento materno necesario para generar un endosperma viable al combinarse con gametos n provenientes del padre (ver Johnston *et al.*, 1980). A esto hay que sumarle la posible producción de gametos $2n$ por parte del progenitor masculino. Todas estas condicionantes limitan el análisis que podemos hacer sobre la distribución de niveles de resistencia en la progenie desde que no sabemos cuántas copias de alelos provenientes del padre y la madre recibió cada individuo.

Por otro lado, la cepa que se utilizó para analizar los niveles de resistencia de la progenie F1 fue muy poco agresiva, lo que se evidencia en la baja proporción de plantas enfermas del testigo susceptible 'Chieftain' (0,35). La baja agresividad de la cepa UY043 se confirmó luego con el experimento de interacción entre genotipo y cepa (Cuadro 6), donde la cepa aparece diferenciada por su menor capacidad de provocar enfermedad (menor

virulencia). Esta condición se manifiesta también en un menor poder de discriminación entre individuos con niveles de resistencia altos e intermedios (Figura 5). Esto confunde en la distribución estas categorías, e hizo que el continuo de respuestas de los genotipos de la progenie apareciera concentrado en los estratos más altos de resistencia. Esta respuesta se evidenció por el análisis mediante el modelo lineal generalizado, que solo pudo diferenciar los extremos más resistentes y más susceptibles de la distribución, así como por el análisis de conglomerados, que agrupó a 70 individuos de 124 (incluyendo a los padres) como el grupo de genotipos más resistentes (“grupo 1”). Utilizando una cepa más virulenta se podría esperar una distribución gradual mejor definida, con diferencias significativas entre genotipos de diferentes estratos de resistencia.

De todas formas, bajo las condiciones de este trabajo, el hecho de que surjan individuos completamente susceptibles del cruzamiento entre dos individuos con cierto nivel de resistencia puede tener alguna/as de las siguientes explicaciones: i) que esos individuos hayan recibido menos o más copias de algún/os *locus/loci* dada la segregación desbalanceada del triploide y/o la producción de gametos masculinos $2n$, ii) que hayan recibido algún/os *locus/loci* recesivos de padres en heterocigocis (tratándose de efectos aditivos, dominancia o sobredominancia) y iii) que existan efectos genéticos más complejos producto de interacciones específicas entre el cruzamiento de los genotipos seleccionados. Estos tres puntos también explicarían la aparición de individuos tendientes a ser más resistentes que los dos padres (no comprobado estadísticamente en este trabajo), y en consecuencia la tendencia a la segregación transgresiva observada. Para probar o descartar alguna de estas hipótesis, en primer lugar, se debería confirmar la ploidía de los individuos analizados de la progenie.

Las distribuciones continuas de las frecuencias de fenotipos de resistencia como la que aquí se observa tienen bases genéticas amplias que son por lo general explicadas por varios genes (si no ocurriesen desvíos en la segregación mendeliana como los ya mencionados). El control poligénico para MB fue confirmado por Tung *et al.* (1990b) utilizando diferentes fuentes de resistencia de especies silvestres diploides y cepas de la raza 1 y 3. En estos trabajos, los autores explicaban el control poligénico por la inexistencia de una co-evolución entre el patógeno y el huésped que impide la presión de selección natural para genes con efectos específicos de resistencia (Tung *et al.*, 1990a). Esta podría ser la situación para *cmm* y *Rs*. En otras especies como el tomate (*Solanum lycopersicon*), el control poligénico de la resistencia a la marchitez bacteriana también es la forma de herencia más común hasta ahora estudiada (Yang y Francis, 2007). Para estos casos y desde el punto de vista del mejoramiento genético, la acumulación de genes con efecto positivo en un mismo individuo es una estrategia clave. Este proceso de acumulación o piramidación, debería ser usado en el mejoramiento de papa por resistencia a MB con la finalidad de acumular genes de resistencia de una misma fuente (puede ser el caso de *cmm*) y para combinar diferentes fuentes de resistencia. Esto último ayudaría a aportar efectividad y estabilidad a la característica, por ejemplo ante cambios en el ambiente (sobre todo por temperatura). Para esto, los marcadores moleculares pueden ser una buena herramienta, y en este sentido los trabajos en tomate pueden servir de ejemplo (ver Carmeille *et al.*, 2006).

El análisis de los niveles de resistencia promedio (porcentaje de plantas con marchitamiento) por cepa en seis genotipos de *cmm* detectó diferencias significativas en el nivel de virulencia de las cinco cepas, distinguiéndose dos grupos: el de las más agresivas, conformado por cuatro cepas, y la menos agresiva, únicamente la cepa UY043. La existencia de diferentes niveles de

virulencia en la raza 3 biovar 2 había sido previamente reportada (French y de Lindo, 1982; Watanabe *et al.*, 1992). La conformación de únicamente dos grupos podría deberse al limitado número de cepas analizadas en este trabajo así como a la escasa diversidad genética encontrada en general en la raza 3 biovar 2 de Rs (Fregan y Prior, 2005) y en particular en las cepas locales en Uruguay (Siri *et al.*, 2007).

Por otro parte, no se detectó resistencia de tipo cepa-específica. Nuestros resultados podrían estar condicionados por la estrecha diversidad genética entre las cepas. Pequeñas diferencias genéticas entre las cepas de este grupo permitirían cambios en su habilidad patogénica y su virulencia (efecto cepa) pero estas diferencias no determinarían interacciones con los diferentes genotipos utilizados de cmm. Probablemente las cepas utilizadas por French y de Lindo (1982) tenían mayor variabilidad genética que las que participaron en nuestro ensayo, dado que se trataba de la raza 1 y de diferentes orígenes (países) de la raza 3. Por el lado del hospedero, con el limitado número de genotipos evaluados en el experimento, los resultados indicarían que el tipo de resistencia a la MB en cmm sería de tipo horizontal. La resistencia cepa-específica encontrada en *S. phureja* se explicaría por la oportunidad de co-evolución de largo plazo entre el patógeno y el hospedero, factor que también puede explicar la poca cantidad de genes que intervienen en la resistencia (Rowe y Sequeira, 1970). Por otro lado, El limitado número de genotipos cmm analizados (dos genotipos de cmm parentales más tres individuos de su progenie) y de cinco cepas de la raza 3 biovar 2 de Rs denotan la baja variabilidad genética en el experimento por lo que nuestros resultados deben considerarse preliminares.

Surgen elementos de análisis que se deberán profundizar en futuros trabajos. La primera inoculación que se hizo con la cepa UY036 logró

discriminar el nivel de resistencia de los parentales de la progenie. Este dato no fue confirmado por los experimentos siguientes. Al descartar cambios en el orden de la resistencia debido a efectos de interacción entre la cepa y los genotipos, la única posibilidad que explica este resultado son variantes a nivel ambiental que modifiquen las respuestas de los genotipos con determinadas cepas. En la literatura, varios autores marcan esta dificultad a la hora de realizar tamizados bajo condiciones controladas (Rowe y Sequeira, 1970; Tung *et al.*, 1990a; Tung *et al.*, 1990b.) A pesar de haber uniformizado las condiciones ambientales de nuestros experimentos, pequeños cambios de temperatura podrían provocar cambios en la agresividad de las cepas o en el nivel de expresión de resistencia de los genotipos de cmm. Esto puede verse amplificado por la falta de aleatorización en la localización de los diferentes genotipos. Por tanto es fundamental repetir los experimentos en el tiempo y realizar diseños de bloques en caso de tener dudas sobre la uniformidad del ambiente, aun cuando estas variaciones sean mínimas. Las repeticiones aumentarían considerablemente los trabajos asociados a la técnica de tamizado bajo condiciones controladas pero mejoraría la confiabilidad de los datos.

Por último, las cepas más virulentas lograron discriminar mejor los diferentes grados de resistencia de cada genotipo por lo que se recomienda utilizarlas en procesos de tamizado y estudios genéticos. La proporción de plantas con síntomas del control susceptible (en este caso, el cultivar 'Chieftain') puede ser un buen indicador de la virulencia de la cepa y del ajuste de otras condiciones del experimento que afectan el progreso de la enfermedad (temperatura y luminosidad), y por tanto, contribuye a interpretar mejor los resultados.

2.5. BIBLIOGRAFÍA

- Carmeille, A.; Caranta, C.; Dintinger, J.; Prior, P.; Luisetti, J.; Besse, P. 2006. Identification of QTLs for *Ralstonia solanacearum* race 3-phyloptype II resistance in tomato. *Theoretical and Applied Genetics*. 113:110-21.
- Carputo, D.; Aversano, R.; Barone, A.; Di Matteo, A.; Iorizzo, M.; Sigillo, L.; Zoina, A.; Frusciante, L. 2009. Resistance to *Ralstonia solanacearum* of sexual hybrids between *Solanum commersonii* and *S. tuberosum*. *American Journal of Potato Research*. 86:196-202.
- Carputo, D.; Castaldi, L.; Caruso, I.; Aversano, R.; Monti, L.; Frusciante, L. 2007. Resistance to frost and tuber soft rot in near-pentaploid *Solanum tuberosum*–*S. commersonii* hybrids. *Breeding Science*. 57: 145-151.
- Centro Internacional de la Papa (CIP). 2009. Potato. <http://www.cipotato.org/potato/>. Accedido en 2009.
- Centro Internacional de la Papa (CIP). 2007. Potato Bacterial wilt. http://www.cipotato.org/potato/pests_diseases/bacterial_wilt/. Accedido en 2007.
- Chen, Y.K.H.; Palta, J.P.; Bamberg, J.B. 1999. Freezing tolerance and tuber production in selfed and backcross progenies derived from somatic hybrids between *S. Tuberosum* L and *S. commersonii* Dun. *Theoretical and Applied Genetics*. 99: 100-107.
- Correll, D.S. (ed). 1962. The potato and its wild relatives. Contributions from the Texas Research Foundation, Botanical Studies 4, 517p.
- Fegan, M. y Prior, P. 2005. How Complex is the “*Ralstonia solanacearum* Species Complex”? In: Bacterial wilt disease and the *Ralstonia solanacearum* species complex. Allen, C.; Prior, P.; Hayward, A.C .eds. Minnesota, USA. APS Press. pp 449-462.
- French, E.R. y De Lindo, L. 1982. Resistance to *Pseudomonas solanacearum* in potato: specificity and temperature sensitivity. *Phytopathology*. 72:1408-1412.

- Galván, G.; Franco Fraguas, L.; Quirici, L.; Santos, C.; Silvera, E.; Siri, M. I.; Villanueva, P.; Raudiviniche, L.; González, M.; Torres, D.; Castillo, A.; Dalla Rizza, M.; Vilaró, F.; Gepp, V.; Ferreira, F.; Pianzzola, M. J. 2006. *Solanum commersonii*: una especie con gran potencial para el mejoramiento genético de papa por resistencia a *Ralstonia solanacearum*. In: Avances de investigación en recursos genéticos en el cono sur II. Procisur, IICA. Uruguay. p. 87-102.
- Hawkes, J.G. 1990. The potato: evolution diversity and genetic resources. Belhaven Press, London. 259p.
- Johnston, S.A.; den Nijs, T.P.N.; Peloquin, S.J.; Hanneman, R.E.1980. The significance of genic balance to endosperm development in interspecific crosses. Theoretical and Applied Genetics. 57: 5–9.
- Kim-Lee, H.; Moon, J. S.; Hong, Y. S.; Kim, M. S.; Cho, H. M. 2004. Bacterial wilt resistance in the progenies of the fusion hybrids between haploid of potato and *Solanum commersonii*. American Journal of Potato Research. 82:129-137.
- Laferriere, L.T.; Helgeson, J.P.; Allen, C. 1999. Fertile *S. tuberosum* + *S. commersonii* somatic hybrids as sources of resistance to bacterial wilt caused by *R. solanacearum*. Theoretical and Applied Genetics. 98:1272-1278.
- McCullagh, R.; Nelder, J.A. 1989. Generalized linear models (2nd Ed.). Monographs on statistics and applied probability, 37. Chapman and Hall, London. 511p.
- Montanelli, C.; Chiari, A.; Chiari, T.; Stefanini, F.; Nascari, G. 1995. Evaluation of resistance to *Pseudomonas solanacearum* in potato under controlled conditions. Euphytica. 81:35-43.
- Murashige, T y Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum. 15: 473-497.
- Palta, J.P.; Simon, G. 1993. Breeding potential for improvement of freezing stress resistance: genetics separation of freezing tolerance, freezing

- avoidance, and capacity to cold acclimate. In: "Advances in Plant Cold Hardiness". Li, P.H.; Christersson, L. eds. Florida, USA. CRC Press. pp 239-310.
- Priou, S.; Aley, P.; Gutarra, L. 2005. Assessment of resistance to bacterial wilt in CIP advanced potato clones. In: Bacterial wilt disease and the *Ralstonia Solanacearum* species complex. Allen, C.; Prior, P; Hayward, A.C. eds. Minnesota, USA. APS Press. pp 261-268.
- Ramsey, J y Schemske, D.W. 1998. Pathways, mechanisms and rates of polyploid formation in flowering plants. Annual Review Ecology and Systematics. 29:467-501.
- Reddick, D. 1930. Frost-tolerant and blight-resistant potatoes. Phytopathology. 20: 987-991.
- Rowe, P. R. y Sequeira, L. 1970. Inheritance of resistance to *Pseudomonas solanacearum* in *Solanum phureja*. Phytopathology. 60: 1499-1502.
- Saddler, G.S. 2005. Management of bacterial wilt disease. In: Bacterial wilt disease and the *Ralstonia solanacearum* species complex. Allen, C.; Prior, P.; Hayward, A.C. eds. Minnesota, USA. APS Press. pp 121-132.
- Schmiediche, P. 1988. Breeding for resistance to *Pseudomonas solanacearum*. In: Report of the planning conference on bacterial diseases of the potato in 1987. French, E.R. ed. Lima, Peru. International Potato Center. pp.19–28.
- Siri, M.I.; Galván, G.A.; Quirici, L.; Villanueva, P.; Ferreira, F.; Franco Fraguas, L.; Pianzola, M.J. 2009. Molecular marker diversity and bacterial wilt resistance in wild *Solanum commersonii* accessions from Uruguay. Euphytica. 165: 371-382.
- Siri, M.I.; Elbaz, M.; Guidot, A.; Prior, P.; Genin, S.; Boucher, C. and M. J. Pianzola. 2007. Comparative genomic and pathogenic analysis between *Ralstonia solanacearum* strains isolated in Uruguay. XIII Congress on Molecular Plant – Microbe Interactions. 21 -27 de julio. Sorrento, Italia. pp232.

- Siri, M.I.; Villanueva, P.; Quirici, L.; Silvera, E.; Franco-Fraguas, L.; Galván, G.; Vilaró, F.; Ferreira, F. y Pianzola, M. 2004. Caracterización de aislamientos de *Ralstonia solanacearum* en Uruguay e implementación de herramientas moleculares para su detección a partir de muestras de suelo y tubérculos. [en línea]. 14 de junio de 2009. <http://www.uach.cl/alap2004>.
- Tam, T.R. y Hawkes, J.G. 1986. Cytogenetic studies and the occurrence of triploidy in the wild potato species *Solanum commersonii* Dun. *Euphytica*. 35: 293-302.
- Thurston, H. D. y Lozano, J. C. 1968. Resistance to bacterial wilt of potatoes in Colombian clones of *Solanum phureja*. *American Potato Journal*. 45:51-55.
- Tung, P. X; Rasco, E. T. Jr; Van der Zaag, P.; Schmiediche, P. 1990a. Resistance to *Pseudomonas solanacearum* in the potato. II : Aspects of host-pathogen-environment interaction. *Euphytica*. 45: 211-215.
- Tung, P. X; Rasco, E. T. Jr; Van der Zaag, P.; Schmiediche, P. 1990b. Resistance to *Pseudomonas solanacearum* in the potato. I : Effects of sources of resistance and adaptation. *Euphytica*. 45: 203-210.
- Walker, T.; Collion, M. H., 1998. Priority setting at CIP for the 1998-2000 Medium Term Plan. International Potato Center. Lima, Perú. 48p.
- Watanabe, J.A.; El-Nashaar, H.M.; Iwanaga, M. 1992. Transmission of bacterial wilt resistance by first division restitution (FDR) 2n pollen via 4x×2x crosses in potatoes. *Euphytica*. 60:21–26.
- Yang, W. y Francis, D. M. 2007. Genetics and breeding for resistance to bacterial diseases in tomato: prospects for marker-assisted selection. In: Genetic improvement of Solanaceous crops (Volume 2: Tomato). Razdan, M.K. ; Mattoo, A.K. eds. 2007 Enfield, USA. Science Publishers. pp 379-419.

Zimnoch-Guzowska, E. ; Lojkowska, E.; Pérombelon, M. 2005. Resistance to bacterial pathogens. In : Genetic improvement of Solanaceous crops (Volume 1: Potato). Razdan, M.K. ; Mattoo, A.K. eds. 2005. Enfield, USA. Science Publishers. pp 339–395.

INTROGRESIÓN DE LA RESISTENCIA A LA MARCHITEZ BACTERIANA
DE *Solanum commersonii* Dun. EN EL MEJORMIENTO GENÉTICO DE
PAPA DE URUGUAY²

Resumen

Uruguay es parte del centro de diversidad de *Solanum commersonii* (cmm), ($2n=2x=24$; 1EBN) especie silvestre de papa destacada por su resistencia a la Marchitez Bacteriana (MB) causada por *Ralstonia solanacearum* (Rs). El uso de cmm en el mejoramiento genético de papa ha sido limitado por barreras post-cigóticas que impiden los cruzamientos directos con *S. tuberosum* ssp. *tuberosum* (tbr) ($2n=4x=48$; 4EBN). En este trabajo se puso en práctica un esquema de introgresión de cmm en el germoplasma de tbr con selección por resistencia a la MB en las progenies. El esquema constó de dos pasos que involucran la producción de gametos femeninos no reducidos ($2n$) como forma de romper las barreras causadas por desbalances genéticos en el endosperma de la semilla. En el primer paso, tres genotipos cmm se cruzaron con genotipos de *S. phureja* (phu) ($2n=2x=24$; 2EBN), utilizada como especie puente. En el segundo paso, las progenies (cmm x phu) se cruzaron con el genotipo tbr 382284.16. En cada una de las progenies obtenidas se seleccionó por resistencia a MB mediante inoculación en suelo de plántulas provenientes de cultivo *in vitro*. Se confirmó que mediante el esquema propuesto fue posible incorporar genoma de cmm en el trasfondo genético de tbr. Fueron obtenidas progenies del cruzamiento (cmm x phu) x tbr que presentan buenos niveles de resistencia a MB y que pueden ser usadas en cruzamientos directos con especies $4x$, 4EBN.

Palabras clave: gametos $2n$, *Ralstonia solanacearum*, resistencia a enfermedades, *Solanum phureja*, *Solanum tuberosum*.

² Este capítulo fue preparado en base a las "Normas para autores/as" de la revista *Agrociencia* (Uruguay).

INTROGRESSION OF THE BACTERIAL WILT RESISTANCE OF
Solanum commersonii Dun. IN THE POTATO BREEDING OF URUGUAY

Abstract

Uruguay is in the primary centre of diversity of *Solanum commersonii* (cmm) ($2n=2x=24$; 1EBN), a tuber-bearing species showing resistance to bacterial wilt (BW) caused by *Ralstonia solanacearum* (Rs). Utilization of cmm in potato breeding has been limited by post-zygotic barriers preventing direct crossing with potato, *S. tuberosum* ssp. *tuberosum* (tbr) ($2n=4x=48$; 4EBN). This research reports an introgression scheme aiming to transfer bacterial wilt resistance from cmm into tbr germplasm. The introgression scheme had two crossing steps involving non-reduced $2n$ gametes, which overcome cross fertilization barriers caused by genetic endosperm unbalances. In the first step, three cmm clones were crosses with *S. phureja* (phu) ($2n=2x=24$; 2EBN), used as a bridge species. In the second step, hybrids (cmm x phu) genotypes were crossed with the tbr genotype 382284.16. Screening for selection involved inoculation with Rs to the soil of plantlets obtained by *in vitro* clonal multiplication. The crosses were scant, the introgression scheme was successfully completed, and genotypes (cmm x phu) x tbr with high level of BW resistance were obtained, which can be used in crosses with $4x$, 4 EBN species.

Key words: $2n$ gametes, *Ralstonia solanacearum*, disease resistance, *Solanum phureja*, *Solanum tuberosum*

3.1. INTRODUCCIÓN

El proceso de introgresión puede ser definido en un sentido amplio como la incorporación de genes de un individuo o población (donante) dentro del trasfondo genético de otro individuo diferente (receptor) (Hermsen, 1994). La introgresión por vía sexual comienza con hibridaciones entre el donante y el receptor y termina con la selección adaptativa de los nuevos genotipos originados. El proceso puede darse en forma natural o mediado por el hombre y tiene un gran impacto en la evolución de las especies y el mejoramiento genético de cultivares. Si bien de esta forma se han incorporado muchas características favorables de especies silvestres a la papa cultivada (ver Bradshaw 2007) se estima que solo un 10 % de las especies han sido exploradas para utilizar en programas de mejoramiento (Buding y Gavrilenko, 1994).

Dentro de la subsección *Potatoe* del género *Solanum* existen dos tipos de barreras que impiden las hibridaciones inter-específicas: barreras pre-cigóticas y barreras post-cigóticas. Las primeras ocurren entre la polinización y la fecundación e involucran factores que impiden la germinación del polen y/o el crecimiento del tubo polínico. Las segundas suceden después de la fecundación y pueden expresarse en diferentes niveles y estadios de esa misma generación o generaciones avanzadas (F2, F3, BC1). Cuando el problema se presenta en el desarrollo del embrión, con frecuencia está implicada la degeneración del endosperma de la semilla (Hermsen, 1994; Camadro *et al.*, 2004).

El endosperma normal balanceado se forma en la fecundación por la fusión de dos núcleos polares (haploides) del saco embrionario y uno de los núcleos generativos del grano de polen. Su función es la de nutrir al embrión en desarrollo. En cruzamientos intra-específicos con la misma ploidía, el

endosperma es resultado de ese balance y los embriones de las semillas que se forman son en su mayoría viables. Lo contrario ocurre con los cruzamientos intra-específicos entre plantas con diferentes ploidías, desbalance que determina el aborto de la mayoría de los embriones que se forman (Hermsen, 1994).

En cruzamientos entre las especies tuberáceas del género *Solanum*, la situación es más complicada. Para resolver y predecir el éxito de los cruzamientos cuando no intervienen barreras pre-cigóticas, se asignó un valor hipotético al endosperma de cada especie de papa (Johnston *et al.*, 1980; Johnston y Hanneman, 1982). A este valor se lo denomina Número de Balance del Endosperma (EBN, *Endosperm Balance Number*) y puede ser 1, 2 o 4. La teoría sostiene que los nuevos embriones están rodeados de un endosperma balanceado cuando la proporción del EBN que aporta la madre es el doble de la que aporta el padre (relación 2:1). Esta condición solo se cumple cuando ambos progenitores tienen igual número de EBN.

El EBN se modifica en conjunto y del mismo modo que la ploidía del individuo. Una duplicación cromosómica aumenta al doble el EBN, mientras que una haploidización lo reduce a la mitad. De esta forma, la manipulación de la ploidía es el método más utilizado para romper este tipo de barreras. Cualquier alteración de la ploidía genera una alteración del mismo orden en el EBN, y por consiguiente, puede permitir o no cualquier tipo de cruzamiento entre especies de *Solanum* (siempre y cuando no intervengan otro tipo de barreras no debidas al balance del endosperma). Así, las duplicaciones del número de cromosomas somático en material diploide, haploidizaciones de tetraploides y el uso de gametos con el número cromosómico no reducido (gametos $2n$) son estrategias ampliamente usadas.

Los gametos $2n$ son producidos naturalmente por muchas especies de plantas. Probablemente la papa cultivada y sus especies silvestres relacionadas

sean el género donde los gametos $2n$ están más estudiados y utilizados por el mejoramiento genético (Carputo *et al.*, 2000). Es en este género que, para la microesporogénesis, se han estudiado tres mutantes meióticos (*ps*, *pc1* y *pc2*) relacionados a la producción de gametos $2n$ (Mok y Peloquin, 1975), siendo más común la mutación *ps* que actúa sobre la formación del huso de la primera división meiótica (Watanabe y Peloquin, 1991). También para la megasporogénesis se han estudiado algunas variantes meióticas, siendo más frecuente la mutación *os* (omisión de la segunda división meiótica) (Werner y Peloquin, 1987). Los efectos genéticos de todas estas mutaciones son ampliamente influenciados por el ambiente. A modo de ejemplo, se citan variaciones en la producción de polen $2n$ que van desde menos del 5% hasta el 80% para un mismo genotipo (Watanabe y Peloquin, 1989).

Según las consecuencias genéticas de estas desviaciones los gametos $2n$ se clasifican en dos categorías: gametos $2n$ RPD (Restitución en la Primera División), cuyas consecuencias genéticas equivalen a la restitución del nivel $2n$ durante la primera división de la meiosis, y gametos $2n$ RSD (Restitución en la Segunda División) cuyas consecuencias genéticas equivalen a la restitución del nivel $2n$ durante la segunda división de la meiosis. Si bien en ambos casos el resultado de las desviaciones de la meiosis normal son gametos $2n$, la carga genética que los compone es diferente. Se estimó que los gametos $2n$ RPD traspasan el 80% del genoma intacto del parental, mientras que los gametos $2n$ RSD solo traspasan el 40%. Esto fue confirmado posteriormente con el uso de marcadores moleculares (Barone *et al.*, 1995). Las reducciones con respecto al 100% (genoma intacto del parental) son producto de los entrecruzamientos (en el caso de gametos $2n$ RPD) y de los entrecruzamientos más la separación de homólogos (en el caso de gametos $2n$ RSD). Por lo tanto, las consecuencias de este factor van a depender de/l el/los gen/es que se quiera/n transmitir y de su distancia al centrómero.

Solanum commersonii Dun. (cmm) (Hawkes, 1990) es una especie silvestre diploide ($2n=2x$; 1EBN). Uruguay forma parte de su centro de diversidad primario, que se extiende por las provincias de Buenos Aires y el litoral argentino hasta el extremo sur de Brasil (Correll, 1962; Hawkes, 1994). Esta especie ha sido destacada desde décadas atrás por su alta potencialidad para el mejoramiento de papa debido a su resistencia al frío y a sequías (Reddick, 1930; Palta y Simon, 1993; Chen *et al.*, 1999; Carputo *et al.* 2007). Entre los factores bióticos, además de resistencias a enfermedades causadas por virus y hongos, se destaca su alta resistencia a la marchitez bacteriana de la papa (MB) causada por la bacteria *Ralstonia solanacearum* (Laferriere *et al.*, 1999; Kim-Lee *et al.*, 2004; Galván *et al.*, 2006; Carputo *et al.*, 2009; Siri *et al.*, 2009). La MB es la segunda enfermedad en el cultivo de papa en Uruguay y el mundo. El uso de cmm en el mejoramiento genético de la papa ha sido limitado, entre otros factores, por barreras a la hibridación post-cigóticas con *Solanum tuberosum* (tbr) ($2n=4x$; 4EBN), que involucran el balance del endosperma.

Masuelli *et al.* (1992) tamizaron algunas accesiones de cmm para la producción de gametos no reducidos. Comprobaron que el 60% de las accesiones caracterizadas produjeron gametos $2n$, tanto femeninos como masculinos. A su vez, confirmaron que los triploides generados a partir de la hibridación con especies diploides (2EBN) también produjeron gametos no reducidos que podrían fecundarse normalmente con gametos n de tbr. Posteriormente, Carputo *et al.* (1997), obtuvieron híbridos triploides entre un clon de cmm duplicado ($2n=4x=48$, 2EBN) y un diploide 2EBN (*S. tuberosum*-*S. phureja*). Estos triploides fueron cruzados como hembra con diferentes variedades elite de tbr ($2n=4x=48$, 4EBN) y generaron algunos híbridos, la mayoría pentaploides y algunos aneuploides (casi pentaploides). Estos resultados muestran evidencia de la formación de gametos femeninos no reducidos en los triploides. Los (casi) pentaploides fueron cruzados tanto como

hembras y como machos con tbr, generando las diferentes generaciones de retrocruzamiento. Barone *et al.* (1999, 2000 y 2002) confirmaron mediante marcadores moleculares específicos que los genomas de cmm y tbr se recombinaron, y que es posible realizar introgresiones para caracteres específicos de interés, recuperando luego características de tbr en los sucesivos retrocruzamientos.

Según las experiencias anteriores, basados exclusivamente en la producción de gametos $2n$ y cruzamientos sexuales dirigidos, es posible sortear las barreras de incompatibilidad entre cmm y tbr. Disponer de un mecanismo de introgresión fácil de aplicar, que utilice herramientas sencillas y que sea eficiente desde el punto de vista genético, sería un aporte significativo a los programas de mejoramiento genético de papa. De esta forma se podría incorporar genoma de esta especie silvestre nativa al trasfondo genético de *S. tuberosum*, posibilitando por primera vez su uso en el mejoramiento genético en Uruguay. El objetivo de este trabajo fue poner en práctica un esquema de introgresión de cmm en el germoplasma de tbr, basado en cruzamientos sexuales dirigidos y la producción de gametos no reducidos. Se tomó como criterio de selección la resistencia a la MB presente en la especie donante.

3.2. MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1. Material vegetal

El esquema de introgresión utilizado se presenta en la Figura 1. Se utilizaron tres genotipos de cmm provenientes del banco de germoplasma del Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA), Uruguay: 04204.3, 05.02.6 y 04.02.3. Los primeros dos genotipos fueron elegidos por ser

resistentes mientras que el genotipo 04.02.3 fue medianamente susceptible en la inoculación con una cepa de la raza 3 biovar 2. También se utilizaron dos genotipos de *S. phureja* (phu) (195 y 192) ($2n=2x$; 2EBN) que se usaron como especie puente en el primer paso de la introgresión. Los genotipos phu son provenientes del programa de mejoramiento de papa del INIA (Uruguay) y seleccionados por tuberización en días largos. Por último, el genotipo de tbr 382284.16 ($2n=4x$; 4EBN), originario del Centro Internacional de la Papa (CIP) con resistencia a virus y tizones (F. Vilaró com. pers.) fue utilizado en el segundo paso de la introgresión.

Los cruzamientos se realizaron a partir de plantas creciendo en invernadero con malla anti-insectos, en condiciones de temperatura y fotoperíodo controlados (20°C, 14 horas de luz). Se utilizó polen fresco de flores abiertas de las plantas utilizadas como macho. La polinización se realizó sobre flores emasculadas de las plantas utilizadas como hembra. A los 60 días de la polinización se cosecharon las bayas. Las semillas extraídas fueron tratadas mediante inmersión en una solución de giberelinas ($1500 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) durante 24 horas para romper su dormición. Luego se desinfectaron con una solución de hipoclorito (25%) durante 10 minutos y se sembraron *in vitro* en medio de Murashige y Skoog (MS) (Murashige y Skoog, 1962) con el fin de dejar el material disponible para las evaluaciones. Para estimar la eficiencia de los cruzamientos realizados se llevó registro del número de flores polinizadas, número de bayas obtenidas, número de semillas obtenidas y porcentaje de germinación de las semillas.

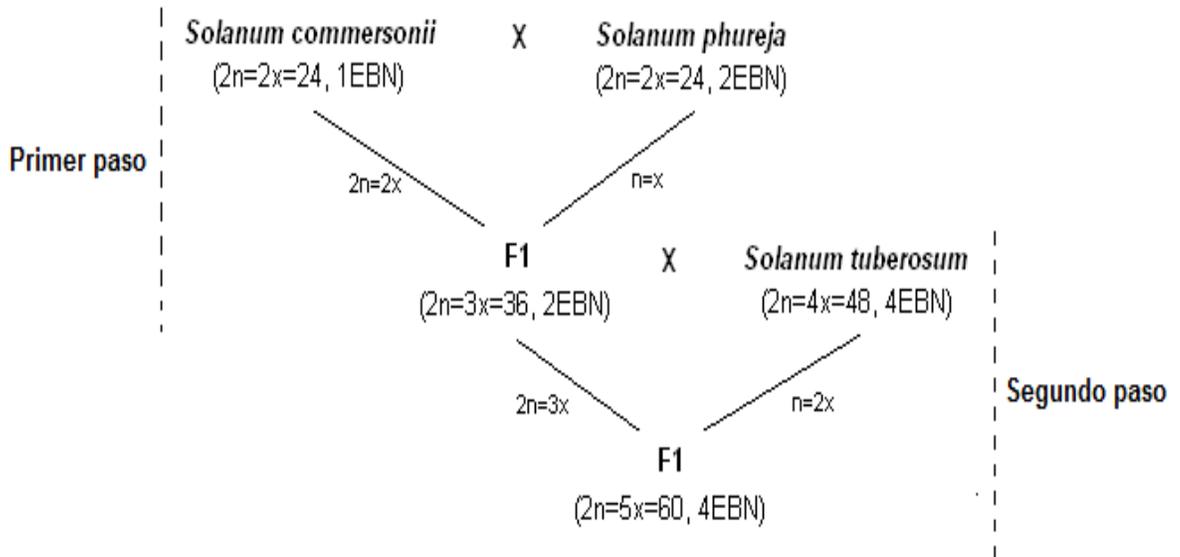


Figura 1. Esquema de cruzamientos utilizado para la introgresión de *S. commersonii* en el genoma de *S. tuberosum*. Se divide en dos pasos que culminan, respectivamente, con la obtención de híbridos triploides y pentaploides. Se utiliza como especie “puente” un clon de *S. phureja* adaptado al día largo. Se espera que en cada paso el progenitor femenino produzca gametos $2n$.

3.2.2. Evaluación de la resistencia al marchitamiento bacteriano

Se utilizó una metodología de inoculación en suelo que permite diferenciar grados de resistencia a MB en plántulas provenientes de multiplicación *in vitro*, basada en Montanelli *et al.* (1995). El inóculo se preparó siguiendo la metodología empleada por Thurston y Lozano (1968) como una suspensión de bacterias en suero fisiológico, a una concentración de 1×10^8 ufc·mL⁻¹. Se partió de colonias incubadas en placas de Petri durante 48 horas a 28°C en medio de crecimiento Kelman conteniendo clorato de 2,3,5-trifenil

tetrazolio (TTC). La concentración del inóculo se estimó mediante lecturas de absorbancia de 0.1 en espectrofotómetro (OD 550 nm), y se corroboró mediante la siembra de diluciones a 1×10^5 y 1×10^6 en placas de Petri con medio TTC con las cuales se obtuvieron recuentos de entre 10 y 100 ufc para la dilución de 1×10^6 y 100 a 300 ufc para la dilución de 1×10^5 . Para las evaluaciones de resistencia se utilizaron plántulas con 5-8 hojas expandidas. En todos los experimentos, las plántulas utilizadas derivaban de la micropropagación *in vitro* a los efectos de asegurar la homogeneidad de desarrollo de plántulas y la obtención de replicas (somaclones) de cada genotipo. Para ello, segmentos de tallo con un nudo (yema) fueron cultivados en frascos con medio MS por tres semanas, seguido de dos semanas de aclimatación en invernadero en el recipiente a usarse en la inoculación. El recipiente consistió de celdas individuales para cada plántula de 17 cm^3 , con 4 g de sustrato hortícola comercial libre de patógenos. Se utilizaron 12 repeticiones (plántulas) por cada genotipo caracterizado. En todos los experimentos se inocularon tres plántulas con suero fisiológico sin bacterias como control negativo.

Para la inoculación, primeramente se generó un orificio en el sustrato con una punta plástica de micropipeta, con el fin de generar heridas a nivel radicular. El orificio de alrededor de 1 cm de profundidad, se realizó a 0,5 cm del tallo principal. Seguidamente, en cada orificio se aplicó 1 mL de la suspensión bacteriana utilizando una pipeta. Después de la inoculación, las plantas se mantuvieron en una cámara con luz artificial (12 horas de luz, $78 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) y 28°C constante medido a nivel radicular. Se realizaron riegos diarios para mantener húmedo el sustrato, sin provocar excesos de agua. La evaluación de síntomas se hizo en forma visual a los 28 días posteriores a la inoculación (dpi). Para determinar el grado de resistencia en los diferentes genotipos de cmm se calculó la proporción de plantas con síntomas sobre el

total de 12 plantas inoculadas. En cada experimento se incluyó el cultivar ‘Chieftan’ de tbr como testigo susceptible.

3.2.3. Estimación de la fertilidad del polen y conteo de número de cromosomas

Para cada planta utilizada en los cruzamientos se evaluó la fertilidad del polen. Se observaron bajo microscopio al menos 200 granos de polen, previa tinción con 1% de acetocarmín.

Se reportan en este trabajo la evaluación del número cromosómico de algunos genotipos (P. Speranza y F. Vilaró, 2010, com. pers.). La técnica se llevó a cabo en el laboratorio de citogenética de la Facultad de Agronomía, Universidad de la República. Se eligió una planta representativa de cada “nivel” del esquema de introgresión para realizar el conteo de cromosomas en metafases mitóticas de raíces en crecimiento.

3.3. RESULTADOS

3.3.1. Primer paso de introgresión: *S. commersonii* x *S. phureja*

La caracterización de la fertilidad del polen mediante tinción de los genotipos que participaron del primer paso de la introgresión reveló la baja fertilidad masculina del clon cmm 05.02.6, en tanto que los otros genotipos de cmm tuvieron valores altos (Cuadro 1). Los clones de phu que fueron utilizados como progenitor masculino también tuvieron un alto porcentaje de polen fértil.

Aunque los tres genotipos de cmm utilizados en los cruzamientos produjeron semillas aparentemente normales, solo germinaron las semillas provenientes de los clones 05.02.6 y 04.02.3 (Cuadro 1). El genotipo 04204.3 produjo muy pocas semillas y en forma muy ineficiente teniendo en cuenta el

número de flores polinizadas. El clon 05.02.6 tuvo mayor capacidad de producir semilla, con una eficiencia relativamente mayor. Para los clones de cmm con buena fertilidad de polen (04204.3 y 04.02.3), se evaluó el cruzamiento recíproco, y ninguno logró formar bayas (ausencia de cuajado).

Las progenies obtenidas de los cruzamientos cmm x phu segregaron para la resistencia a MB, generando individuos muy resistentes (0% de plantas con síntomas) hasta algunos con susceptibilidades altas (Cuadro 3).

Cuadro 1. Individuos utilizados en los cruzamientos del primer paso de la introgresión: *S. commersonii* x *S. phureja*.

Individuo	Especie	Ploidía	EBN	Polen fértil (%)
05.02.6	cmm	3x*	(**)	11
04204.3	cmm	2x	1	99
04.02.3	cmm	2x	1	92
192	phu	2x	2	91
195	phu	2x	2	95

* Dato estimado por citometría de flujo comparando con testigo de referencia 04.02.3, diploide perteneciente a la misma especie (F. Santiñaque, 2009, com. pers.).

** Por su estado triploide podría tener modificaciones al EBN normal de un *S. commersonii* diploide, en función de la carga cromosómica presente en los gametos.

Cuadro 2. Cruzamientos realizados en el primer paso de la introgresión (*S. commersonii* x *S. phureja*) y sus eficiencias.

Cruzamiento	Flores polinizadas	Cuajado (%)	Valor promedio de semillas por		Germinación (%)
			Baya	Polinización	
05.02.6 x 192	31	71	1,14	0,81	60
04.02.3 x 195	- ¹	-	-	-	83
04204.3 x 192	101	31	0,06	0,02	0

¹ sin datos

La evaluación de la resistencia a MB de la progenie 16 individuos del cruzamiento 04.02.3 x 195 mostró segregación transgresiva, con individuos más resistentes que el mejor de los padres. En el caso del cruzamiento 05.02.6 x 192 aproximadamente el 50% de la progenie de siete individuos manifestó buenos niveles de resistencia, con una proporción de plantas con marchitez menor o igual a 0,25. Se observó gran vigor en todos los genotipos obtenidos de ambas progenies, dado por la velocidad de crecimiento, el grosor del tallo y el tamaño de las hojas en comparación con ambos padres. Los dos genotipos más resistentes de cada progenie (06202.6, 06202.7, 06201.6 y 06201.20) fueron utilizados para la realización del segundo paso de la introgresión.

Cuadro 3. Evaluación de la resistencia a marchitez bacteriana en las progenies 04.02.3 x 195 y 05.02.6 x 192, obtenidas en el primer paso de la introgresión (*S. commersonii* x *S. phureja*).

Progenie: 04.02.3 x 195			Progenie: 05.02.6 x 192		
Genotipo	Material genético	p28dpi ¹	Genotipo	Material genético	p28dpi ¹
04.02.3	<i>cmm</i>	0,75	05.02.6	<i>cmm</i>	0,00
195	<i>phu</i>	0,85	192	<i>phu</i>	0,50
06201.6	<i>cmm x phu</i>	0,00	06202.7	<i>cmm x phu</i>	0,00
06201.20	<i>cmm x phu</i>	0,00	06202.6	<i>cmm x phu</i>	0,00
06201.1	<i>cmm x phu</i>	0,08	06202.8	<i>cmm x phu</i>	0,08
06201.8	<i>cmm x phu</i>	0,17	06202.3	<i>cmm x phu</i>	0,25
06201.11	<i>cmm x phu</i>	0,17	06202.17	<i>cmm x phu</i>	0,33
06201.24	<i>cmm x phu</i>	0,17	06202.4	<i>cmm x phu</i>	0,50
06201.7	<i>cmm x phu</i>	0,17	06202.13	<i>cmm x phu</i>	0,58
06201.3	<i>cmm x phu</i>	0,17	Chieftain	<i>tbr</i>	0,83
06201.15	<i>cmm x phu</i>	0,25			
06201.17	<i>cmm x phu</i>	0,25			
06201.14	<i>cmm x phu</i>	0,25			
06201.31	<i>cmm x phu</i>	0,33			
06201.4	<i>cmm x phu</i>	0,42			
06201.5	<i>cmm x phu</i>	0,42			
06201.12	<i>cmm x phu</i>	0,50			
06201.28	<i>cmm x phu</i>	0,50			
Chieftain	<i>tbr</i>	0,83			

¹ Proporción de plantas enfermas a los 28 días posteriores al trasplante.

3.3.2. Segundo paso de introgresión: (*S. commersonii* x *S. phureja*) x *S. tuberosum*

Los cuatro genotipos seleccionados del cruzamiento cmm x phu mostraron muy poca fertilidad de polen (Cuadro 4). Las características morfológicas de estos genotipos (color de flor, tipo de pétalos, tamaño de flor y tamaño y forma de folíolos) fueron intermedias entre cmm y phu, con claras diferencias con respecto a ambos progenitores. El genotipo 06202.7 no pudo cruzarse ya que produjo muy pocas flores. Los otros tres genotipos se cruzaron como hembras con eficiencias muy bajas (cuadro 5). De las semillas originadas por el genotipo 06202.6 ninguna germinó.

Cuadro 4. Características de los individuos utilizados en los cruzamientos del segundo paso de la introgresión: (*S. commersonii* x *S. phureja*) x *S. tuberosum*.

Individuo	Pedigrí	Material genético	Polen fértil (%)
06202.6	05.02.6 x 192	cmm x phu	9
06202.7	05.02.6 x 192	cmm x phu	11
06201.6	04.02.3 x 195	cmm x phu	15
06201.20	04.02.3 x 195	cmm x phu	18
382284.16	- ¹	tbr (4x)	82

¹ No determinado.

Cuadro 5. Eficiencia de los cruzamientos realizados en el segundo paso de la introgresión: (*S. commersonii* x *S. phureja*) x *S. tuberosum*.

Cruzamiento	Flores polinizadas	Cuajado (%)	Valor promedio de semillas por		Germinación (%)
			baya	polinización	
06202.6 x 382284.16	92	38	0,14	0,05	0
06201.6 x 382284.16	59	37	0,05	0,02	40
06201.20 x 382284.16	56	68	0,13	0,09	60

En el Cuadro 6 se listan todos los genotipos obtenidos del cruzamiento (cmm x phu) x tbr y su fertilidad estimada de polen. Todos los genotipos tuvieron porcentajes de polen fértil mayor al 30%, y en promedio 42%. Se destacó el híbrido 08301.2 con 63% de polen fértil, y por tanto aparentes buenas condiciones para utilizarse como progenitor masculino. Nuevamente, las características morfológicas de estos genotipos (color de flor, tipo de pétalos, tamaño de flor y tamaño y forma de folíolos) fueron intermedias a los progenitores y claramente diferenciables.

Cuadro 6. Fertilidad del polen estimada para los genotipos obtenidos del cruzamiento (*S. commersonii* x *S. phureja*) x *S. tuberosum*.

Genotipo	Pedigrí	Material genético	Polen fértil (%)
08301.1	06201.6 x 382284.16	(cmm x phu) x tbr	40
08301.2	06201.6 x 382284.16	(cmm x phu) x tbr	63
08302.1	06201.20 x 382284.16	(cmm x phu) x tbr	33
08302.2	06201.20 x 382284.16	(cmm x phu) x tbr	36
08302.3	06201.20 x 382284.16	(cmm x phu) x tbr	35
08302.4	06201.20 x 382284.16	(cmm x phu) x tbr	39
08302.5	06201.20 x 382284.16	(cmm x phu) x tbr	49

Cuadro 7. Evaluación de la resistencia a marchitez bacteriana en las progenies (*S. commersonii* x *S. phureja*) x *S. tuberosum*, obtenidas del el segundo paso de la introgresión.

Progenie 06201.20 x tbr (382284.16)			Progenie 06201.6 x tbr (382284.16)		
Individuo	Material genético	p 27dpi ¹	Individuo	Material genético	p 27dpi ¹
08302.4	(<i>cmm</i> x <i>phu</i>) x <i>tbr</i>	0,29	08301.1	(<i>cmm</i> x <i>phu</i>) x <i>tbr</i>	0,25
08302.2	(<i>cmm</i> x <i>phu</i>) x <i>tbr</i>	0,47	08301.2	(<i>cmm</i> x <i>phu</i>) x <i>tbr</i>	0,65
08302.1	(<i>cmm</i> x <i>phu</i>) x <i>tbr</i>	0,60	Chieftain	<i>tbr</i>	0,92
08302.3	(<i>cmm</i> x <i>phu</i>) x <i>tbr</i>	0,74			
Chieftain	<i>tbr</i>	0,92			

1 Proporción de plantas enfermas a los 28 días posteriores al trasplante.

Las dos progenies del cruzamiento (*cmm* x *phu*) x *tbr* fueron caracterizadas por su resistencia a MB. Nuevamente se observó segregación para la resistencia. Algunos individuos presentaron buenos niveles de resistencia y otros mostraron proporciones importantes de plantas con síntoma, aunque en todos los casos esas proporciones fueron menores que el testigo susceptible 'Chieftain' de *S. tuberosum* (Cuadro 7).

3.3.3. Conteo de cromosomas

Para conocer la ploidía y confirmar la hibridación sexual se realizó el conteo de cromosomas en células somáticas de algunos individuos seleccionados (Cuadro 8).

Cuadro 8. Número de cromosomas en células somáticas de algunos genotipos que participaron del proceso de introgresión (Speranza, P., Vilaró, F., 2010, com. pers).

Genotipo	Pedigrí	Material genético	Nº de cromosomas
04.02.3	*	cmm	24
195	*	phu	24
382284.16	*	tbr	48
06201.20	04.02.3 x 195	cmm x phu	36
08302.3	06201.20 x 382284.16	(cmm x phu) x tbr	63

* Materiales provenientes del programa de mejoramiento de INIA (Uruguay).

Considerando el número básico de cromosomas $x=12$, el genotipo 06201.20 presentó 36 cromosomas, lo que corresponde a una condición triploide ($3x$), y el genotipo 08302.3 presentó 63 cromosomas y corresponde a un pentaploide más tres cromosomas extras ($5x + 3$). Estos datos confirman la hibridación para los casos de los genotipos estudiados, y la producción de gametos $2n$ por parte de uno de los parentales. La hibridación coincide con las características morfológicas observadas para los genotipos obtenidos de las diferentes progenies (Figura 2).

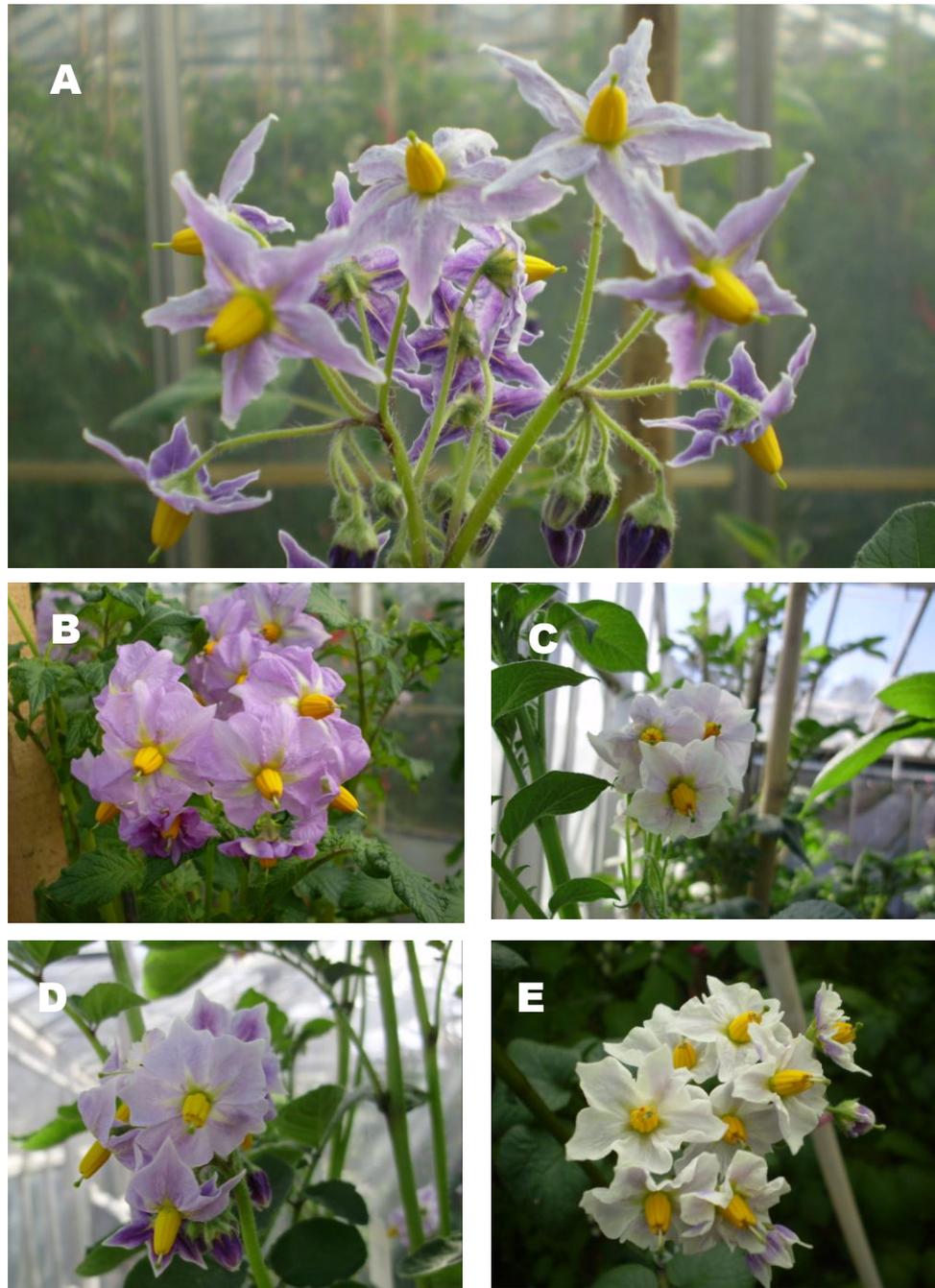


Figura 2. Inflorescencias de algunos individuos que participaron del proceso de introgresión. (A) *S. commersonii* 04.02.3. (B) *S. phureja* 195. (C) *S. tuberosum* 382284.16. (D) Híbrido 06201.20 (*cmm* 04.02.3 x *phu* 195) (E) Híbrido 08.302.4 (382284.16 x 06201.20).

3.4. DISCUSIÓN

Probablemente, la papa sea el cultivo con mayor reservorio de diversidad genética dado el alto número de especies silvestres relacionadas que crecen en diferentes ambientes. La incorporación de algunas características favorables ha sido limitada, entre otros factores externos, por barreras internas que impiden los cruzamientos entre diferentes especies o grupos de especies. Estas barreras han tenido una función evolutiva importante en la preservación de la integridad de especies simpátricas (ver Camadro *et al.*, 2004). En la actualidad, considerables esfuerzos del mejoramiento genético son puestos en lograr romper o evadir estas barreras para generar germoplasma superior adaptado.

Muchos trabajos han confirmado la presencia de barreras post-cigóticas entre *cmm* y *tbr* ($2n=4x$; 4EBN) debido a incompatibilidades del endosperma, desde que esta especie ha funcionado como modelo en la elaboración de la teoría del EBN (Johnston *et al.*, 1980; Jhonston y Hanneman, 1982; Hawkes y Jackson, 1991; Jackson y Hanneman Jr., 1999). Algunos autores han propuesto alternativas para sortearlas con éxito, que van desde la fusión somática (Laferriere *et al.*, 1999) hasta la manipulación de la ploidía combinando duplicaciones cromosómicas a nivel somático, haploidizaciones y gametos $2n$ (Carputo *et al.*, 1997). En este trabajo, a diferencia de los anteriores, se llevó a cabo por primera vez una estrategia basada exclusivamente en la manipulación de la ploidía a partir de la producción natural de gametos $2n$ en solo dos pasos (cruzamientos) dentro de un esquema de introgresión (Figura 1), el cual involucró a *S. phureja* ($2n=2x$; 2EBN) como especie puente. La particularidad de este esquema es que es muy sencillo de ejecutar, no requiere instrumentos sofisticados ni pasos en laboratorio. Como criterio de selección en los individuos receptores del genoma de *cmm* se tomó la resistencia a MB, aplicando un método de inoculación en plántula bajo condiciones controladas.

Solo uno de los genotipos de cmm (04.02.3) seleccionados para el esquema logró completarlo y formar genotipos híbridos entre cmm, phu y tbr. Esto se constató por las características morfológicas (Figura 2) de las progenies obtenidas (combinación de caracteres de los progenitores) y por el conteo de cromosomas en un individuo por progenie (Cuadro 8). Por lo tanto se confirmó que, con algunos genotipos y el esquema de cruzamientos planteado, es posible romper las barreras de incompatibilidad post-cigóticas ocasionadas por el balance genético del endosperma entre cmm y tbr, mediante la explotación de la producción natural de gametos $2n$ como forma exclusiva de manipular la ploidía.

La presencia de 36 y 63 cromosomas en los individuos 06.201.20 (cmm x phu) y 08302.1 ((cmm x phu) x tbr) respectivamente, confirmó la producción de gametos con el número cromosómico no reducidos de sus progenitores femeninos (04.02.3 y 06.201.20). La presencia de gametos femeninos $2n$ en cmm y sus híbridos $3x$ con especies 2EBN concuerda con las observaciones de Masuelli *et al.* (1992) y Carputo *et al.* (1997).

Las eficiencias obtenidas con el clon triploide de cmm 05.02.6 en los cruzamientos con phu (1,14 semillas por baya) fueron muy superiores a las encontradas para el clon diploide 04.204.3 (0,06 semillas por baya) y a las reportadas por Masuelli *et al.* (1992), quienes obtuvieron como máximo 0,43 semillas por bayas totales cosechadas en cruzamientos entre diferentes genotipos de *S. commersonii* y *S. gourlayi* ($2n=2x=2EBN$). Una posible explicación del alto número de semillas por baya obtenido con el clon 05.02.6 ($3x$) en el primer paso de la introgresión, puede ser la “mayor cercanía” de este genotipo a las especies 2EBN como phu. De todos modos, la F1 generada por este genotipo tuvo problemas en el segundo paso de la introgresión. En efecto, el genotipo 06202.7 (0502.6 x 192) tuvo muy poca floración y el genotipo

06202.6 (0502.6 x 192) no produjo semillas viables en el cruzamiento con tbr (Cuadro 5).

Por otro lado, el genotipo de cmm 04204.3 no produjo semillas viables en su cruzamiento con phu (0% de germinación) (Cuadro 2). Todas estas observaciones confirman la presencia de dos factores que influyen en el éxito del esquema propuesto: i) otros tipos de barreras a la hibridación en el esquema planteado (no relacionadas al balance genético del endosperma) que muchas veces se expresan en diferentes generaciones y estadios de las progenies, ii) no todos los genotipos tienen la misma capacidad de producir gametos femeninos con el número cromosómico no reducidos (como puede ser el caso de los genotipos 06201.20 y 06201.6), por lo que también se esperan diferencias en la eficiencia de producción de semillas viables si la incompatibilidad se concentra en el balance genético del endosperma. La expresión de estos dos factores impide que todos los genotipos elegidos puedan completar el esquema de introgresión propuesto. Esto podría generar dificultad en la utilización de algunos individuos con características interesantes para el mejoramiento, por ejemplo por su resistencia a MB. Si el problema son otras barreras diferentes al balance del endosperma, el cambio de los genotipos de phu y tbr podría resolver la incompatibilidad. Si el problema fuera la baja eficiencia en la producción de gametos $2n$ del genotipo de interés, aumentando el número de cruzamientos realizados se podría superar esta limitante.

El cruzamiento recíproco (phu como hembra) puede ser una opción válida en el primer paso de la introgresión planteada en este esquema. Sin embargo, ninguno de los cruzamientos probados aquí dio resultado, con la ausencia de cuajado de bayas para todos los casos. Esto podría ser consecuencia de una incompatibilidad previa a la fertilización de los óvulos (barreras pre-cigóticas). El mismo resultado fue obtenido por Ehlenfeldt y

Hanneman (1988), quienes cruzaron cmm con *S. chacoense* (diploide 2EBN) y solo lograron éxito cuando cmm se utilizó como hembra.

Pese al bajo número de individuos generados en las progenies cmm x phu y la progenie (cmm x phu) x tbr, se pudieron seleccionar individuos resistentes a MB. La progenie (cmm x phu) que provenía del genotipo cmm 04.02.3 experimentó segregación transgresiva, generando individuos más resistentes que el mejor de los padres. Este hecho fue observado en el capítulo anterior de este trabajo cuando se cruzaron un 3x por un 2x, ambos cmm con cierto nivel de resistencia. En esa oportunidad se explicaba que el número de copias de ciertos alelos (producto de la meiosis desbalanceada de un 3x), la segregación de alelos recesivos favorables en un solo individuo y la generación de nuevas interacciones génicas favorables en el cruzamiento específico podrían explicar la segregación transgresiva.

El mismo caso que aquí se presenta fue observado por Watanabe *et al.* (1992) quienes trabajaron con hibridaciones entre especies de *Solanum* 2x x 4x, y obtuvieron progenies resistentes de dos cruzamientos entre susceptibles, utilizando métodos de inoculación en plántulas. Los autores explicaban este resultado en la condición poligénica de la resistencia y en la acumulación de genes recesivos de resistencia en un solo individuo (u otro tipo de nueva interacción favorable que se forme en el cruzamiento específico). Tung *et al.* (1990), trabajando con otras fuentes de resistencia diploide, también observaron individuos resistentes obtenidos del cruzamiento de padres susceptibles. En este caso, se explicaba que la adaptación del genotipo al ambiente estaba muy relacionada a la expresión de la resistencia genética a MB. Por tal motivo, para generar progenies con buenos niveles de resistencia, uno o ambos padres deberían tener buena aptitud combinatoria general para

factores de adaptación al ambiente, en especial a altas temperaturas. El gran vigor observado en las plántulas de las progenies (cmm x phu) puede tener relación con este último concepto. Al generarse plántulas más vigorosas y adaptadas al medio se aumentaron los índices de supervivencia. Esto se observó también en las progenies (cmm x phu) x tbr que mostraron genotipos con buen nivel de resistencia (proporción de plantas con síntoma de 0,25 y 0,29) pese a que ninguno de sus progenitores originales (genotipos de cmm, phu y tbr) poseen esta característica. Esto confirma las observaciones de Tung *et al.* (1990) y sugiere que en la inoculación de plántulas la adaptación de los genotipos al ambiente tiene que ver en la expresión de la resistencia. Se debería confirmar si esta expresión de la resistencia es igualmente efectiva bajo condiciones de campo.

Los genotipos resistentes obtenidos del cruzamiento entre (cmm x phu) x tbr fueron usados sin problema en cruzamientos con genotipos 4x; 4EBN (Francisco Vilaró, comunicación personal, junio de 2009). Este hecho permite planificar cruzamientos con el fin de combinar esta nueva fuente de resistencia con el germoplasma seleccionado en el CIP y en Embrapa que involucra otras fuentes de resistencia a MB. Por otro lado, es posible que los genotipos provenientes del cruzamiento entre (cmm x phu) x tbr mantengan gran parte de la heterosis de la especie silvestre, dependiendo del tipo de gameto femenino $2n$ involucrado en ambos pasos del proceso de introgresión (gametos $2n$ RPD o gametos $2n$ RSD). Este hecho es una particularidad importante de este esquema de introgresión, ya que mantener buenos niveles de heterosis puede facilitar esfuerzos de introgresión para características de base genética poligénica y compleja, como puede ser la resistencia a MB. Por lo tanto, los

genotipos generados en este trabajo son de gran valor para el mejoramiento genético de papa en Uruguay.

3.5. BIBLIOGRAFÍA

- 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. *Theoretical and Applied Genetics*. 104: 539–546.
- Barone, A.; Sebastiano, A.; Carputo, D.; Della Rocca, F.; Frusciante, F. 2000. Molecular marker-assisted introgression of the wild *Solanum commersonii* genome into the cultivated *S. tuberosum* gene pool. *Theoretical and Applied Genetics*. 102: 900-907.
- Barone, A.; Sebastiano, A.; Carputo, D. 1999. Chromosome pairing in *Solanum commersonii* – *S. tuberosum* sexual hybrids detected by *commersonii* specific RAPDs and cytological analysis. *Genome*. 42: 218–224.
- Barone, A.; Gebhardt, C.; Frusciante, L. 1995. Heterozygosity in 2n gametes of potato evaluated by RFLP markers. *Theoretical and Applied Genetics*. 91:98–104.
- Bradshaw, J.E. 2007. Potato-Breeding Strategy. In: *Potato biology and biotechnology. Advances and perspectives*. Vreugdenhil, D. (eds). Amsterdam, The Netherlands. Elsevier. pp 157- 177.
- Buding, K.Z. y Gavrilenko, T.A. 1994. Genetics bases of remote hybridization in potato. *Russian Journal of Genetics*. 30:1188-1196.
- Camadro, E. L.; Carputo, D.; Peloquin, S. J. 2004. Substitutes for genomic differentiation in tuber-bearing *Solanum*: interspecific pollen-pistil incompatibility, nuclear-cytoplasmic male sterility, and endosperm. *Theoretical and Applied Genetics*. 109: 1369-1376.

- Carputo, D.; Aversano, R.; Barone, A.; Di Matteo, A.; Iorizzo, M.; Sigillo, L.; Zoina, A.; Frusciante, L. 2009. Resistance to *Ralstonia solanacearum* of sexual hybrids between *Solanum commersonii* and *S. tuberosum*. *American Journal of Potato Research*. 86:196-202.
- Carputo, D.; Castaldi, L.; Caruso, I.; Aversano, R.; Monti, L.; Frusciante, L. 2007. Resistance to frost and tuber soft rot in near-pentaploid *Solanum tuberosum*–*S. commersonii* hybrids. *Breeding Science*. 57: 145-151.
- Carputo, D.; Barone, A.; Frusciante, L. 2000. 2n gametes in the potato: essential ingredients for breeding and germplasm transfer. *Theoretical and Applied Genetics*. 101: 805-813.
- Carputo, D.; Barone, A.; Cardi, T.; Sebastiano, A.; Frusciante, L.; Peloquin, S. 1997. Endosperm balance number manipulation for direct *in vivo* germplasm introgression to potato from a sexually isolate relative (*Solanum commersonii* Dun.). *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 94: 12013-12017.
- Chen, Y.K.H.; Palta, J.P.; Bamberg, J.B. 1999. Freezing tolerance and tuber production in selfed and backcross progenies derived from somatic hybrids between *Solanum tuberosum* L. and *S. commersonii* Dun. *Theoretical and Applied Genetics*. 99: 100-107.
- Correll, D.S. (ed). 1962. The potato and its wild relatives. Contributions from the Texas Research Foundation, Botanical Studies 4, 517p.
- Ehlenfeldt, M.K. y Hanneman, R.J. 1988. Genetic control of endosperm balance number (EBN): three additive loci in a threshold-like system. *Theoretical and Applied Genetics*. 75:825-832.
- Galván, G.; Franco Fraguas, L.; Quirici, L.; Santos, C.; Silvera, E.; Siri, M. I.; Villanueva, P.; Raudviniche, L.; González, M.; Torres, D.; Castillo, A.; Dalla Rizza, M.; Vilaró, F.; Gepp, V.; Ferreira, F.; Pianzola, M. J. 2006. *Solanum commersonii*: una especie con gran potencial para el mejoramiento genético de papa por resistencia a *Ralstonia solanacearum*. In: Avances de investigación en recursos genéticos en el cono sur II. Procisur, IICA. Uruguay. p. 87-102.

- Hawkes, J. G. 1994. Origin of the cultivated potato and species relationship. In: Potato Genetics. Bradshaw J.E.; Mackay G.R. ed. Wallingford, UK. CAB International. pp 3-42.
- Hawkes, J.G. 1990. The potato: evolution diversity and genetic resources. Belhaven Press, London. 259p.
- Hermesen, J. G. 1994. Introgression of Genes from Wild Species, Including Molecular and Cellular Approaches. In: Potato Genetics. Bradshaw J.E. y Mackay G.R. ed. Wallingford, UK. CAB International. pp 515-538.
- Jackson, S.A y Hanneman Jr, R.E. 1999. Crossability between cultivated and wild tuber-and-non-tuber-bearing *Solanums*. *Euphytica*. 109:51-67.
- Johnston, S.A.; Hanneman, R.E. 1982. Manipulations of endosperm balance number overcome crossing barriers between diploid *Solanum* species. *Science*. 217: 446–448.
- Johnston, S.A.; den Nijs, T.P.N.; Peloquin, S.J.; Hanneman, R.E.1980. The significance of genic balance to endosperm development in interspecific crosses. *Theoretical and Applied Genetics*. 57: 5–9.
- Kim-Lee, H.; Moon, J. S.; Hong, Y. S.; Kim, M. S.; Cho, H. M. 2004. Bacterial wilt resistance in the progenies of the fusion hybrids between haploid of potato and *Solanum commersonii*. *American Journal of Potato Research*. 82:129-137.
- Laferriere, L.T.; Helgeson, J.P.; Allen, C. 1999. Fertile *S. tuberosum* + *S. commersonii* somatic hybrids as sources of resistance to bacterial wilt caused by *R. solanacearum*. *Theoretical and Applied Genetics*. 98:1272-1278.
- Masuelli, R. W.; Camadro, E. L.;Mendiburu, A. O. 1992. 2n gametes in *Solanum commersonii* and cytological mechanisms of triplandroid formation in triploid hybrids of *Solanum commersonii* x *Solanum gourlayi*. *Genome*. 35: 864-869.
- Mok, D.W.S., Peloquin, S.J. 1975. Three mechanisms of 2n pollen formation in diploid potatoes. *Canadian Journal of Genetic and Cytology*. 17:217–225.

- Murashige, T. y Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. 15: 473-497.
- Palta, J.P.; Simon, G. 1993. Breeding potential for improvement of freezing stress resistance: genetics separation of freezing tolerance, freezing avoidance, and capacity to cold acclimate. In: "Advances in Plant Cold Hardiness". Li, P.H.; Christersson, L. eds. Florida, USA. CRC Press. pp 239-310.
- Priou, S.; Aley, P.; Gutarra, L. 2005. Assessment of resistance to bacterial wilt in CIP advanced potato clones. In: Bacterial wilt disease and the *Ralstonia Solanacearum* species complex. Allen, C.; Prior, P; Hayward, A.C. eds. Minnesota, USA. APS Press. pp 261-268.
- Reddick, D. 1930. Frost-tolerant and blight-resistant potatoes. *Phytopathology*. 20: 987-991.
- Siri, M.I.; Galván, G.A.; Quirici, L.; Villanueva, P.; Ferreira, F.; Franco Fraguas, L.; Pianzola, M.J. 2009. Molecular marker diversity and bacterial wilt resistance in wild *Solanum commersonii* accessions from Uruguay. *Euphytica*. 165: 371-382.
- Thurston, H. D. y Lozano, J. C. 1968. Resistance to bacterial wilt of potatoes in Colombian clones of *Solanum phureja*. *American Potato Journal*. 45:51-55.
- Tung, P.X.; Rasco, E.T.Jr.; Van der Zaag, P.; Schmiediche, P. 1990. Resistance to *Pseudomonas solanacearum* in the potato. I : Effects of sources of resistance and adaptation. *Euphytica*. 45: 203-210.
- Watanabe, J.A.; El-Nashaar, H.M.; Iwanaga, M. 1992. Transmission of bacterial wilt resistance by first division restitution (FDR) 2n pollen via 4x×2x crosses in potatoes. *Euphytica*. 60:21-26.
- Watanabe, K. y Peloquin, S.J. 1991. The occurrence and frequency of 2n pollen in 2x, 4x, and 6x wild tuber-bearing *Solanum* species from Mexico, and Central and South America. *Theoretical and Applied Genetics*. 82:621-626.

Werner, J.E. y Peloquin, S.J. 1987. Frequency and mechanisms of $2n$ egg formation in haploid tuberosum-wild species F1 hybrids. *American Potato Journal*. 64:641–654.

CONCLUSIONES GENERALES

El método de inoculación en suelo ajustado para este trabajo permitió explorar una colección de genotipos de cmm como nueva fuente de resistencia a la marchitez bacteriana de la papa. La resistencia en algunos individuos de cmm se considera muy alta bajo estas condiciones de inoculación. Se evidencia la necesidad de realizar tamizados dentro de la especie dada la alta variabilidad encontrada en la característica.

La distribución de los niveles de resistencia dentro de la progenie entre dos clones cmm marcaría un patrón poligénico, aunque esta conclusión es preliminar, en la medida que uno de los parentales cmm sería triploide.

El análisis de los niveles de resistencia promedio utilizando seis genotipos de cmm y cinco cepas de Rs raza 3 biovar 2, todas aisladas de cultivos de papa comercial en Uruguay, detectó diferencias significativas en el nivel de virulencia de las cepas.

En el mismo experimento, no se detectó resistencia de tipo cepa-específica para los genotipos y cepas utilizados. Por lo tanto, el ordenamiento de los niveles de resistencia para marchitez bacteriana de diferentes genotipos de cmm no se modificó significativamente para las cepas de la raza 3 biovar 2 utilizadas en este trabajo.

Las cepas más virulentas lograron discriminar mejor los diferentes grados de resistencia de cada genotipo por lo que se recomienda utilizarlas en procesos de tamizado y estudios genéticos.

Las variaciones a nivel ambiental podrían modificar las respuestas de los genotipos con determinadas cepas. Por tanto es fundamental repetir los experimentos en el tiempo y realizar diseños de bloques en caso de tener dudas sobre la uniformidad del ambiente.

La proporción de plantas con síntomas del control susceptible (en este caso, el cultivar 'Chieftain') puede ser un buen indicador de la virulencia de la cepa y del ajuste de otras condiciones del experimento que afectan el progreso de la enfermedad (temperatura y luminosidad), y por tanto, contribuye a interpretar mejor los resultados.

Se confirma que, con algunos genotipos y el esquema de cruzamientos planteado, es posible romper las barreras de incompatibilidad post-cigóticas ocasionadas por el balance genético del endopserma entre *cmm* y *tbr*, mediante la producción de gametos $2n$ como forma exclusiva de manipular la ploidía.

El esquema de introgresión utilizado resultó muy sencillo de aplicar. Involucra solo dos cruzamientos, no se utilizan instrumentos sofisticados y no tiene pasos realizados en el laboratorio. Además, considerando las consecuencias genéticas en la producción de gametos $2n$, la eficiencia de transmisión de caracteres poligénicos y complejos puede verse favorecida.

No todos los genotipos de *cmm* pueden completar con éxito este esquema debido a: i) otros tipos de barreras a la hibridación (no relacionadas al balance genético del endopserma) que muchas veces se expresan en diferentes generaciones y estadios de las progenies, ii) diferencias entre

genotipos en la capacidad de producir gametos con el número cromosómico no reducido.

Pese al bajo número de individuos generados en las progenies *cmm* x *phu* y las progenies (*cmm* x *phu*) x *tbr*, se pudieron seleccionar individuos resistentes a marchitez bacteriana bajo nuestras condiciones de inoculación, inclusive utilizando genotipos de *cmm* con niveles de resistencia intermedia. La generación de nuevos híbridos con altos niveles de adaptación ambiental podría estar explicando esta situación.

Los genotipos resistentes obtenidos del cruzamiento entre (*cmm* x *phu*) x *tbr* fueron usados sin problema en cruzamientos con genotipos 4x; 4EBN, factor que confirma su utilidad en el mejoramiento genético de papa.

BIBLIOGRAFÍA GENERAL

- Bamberg, J. y Del Río, A. 2005. Conservation of potato genetics resources. In: Genetic improvement of Solanaceous crops (Volume I: Potato). Razdan, M.K. ; Mattoo, A.K. eds. 2005. Enfield, USA. Science Publishers. pp 1-38.
- 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. Theoretical and Applied Genetics. 104: 539–546.
- Barone, A.; Sebastiano, A.; Carputo, D.; Della Rocca, F.; Frusciante, F. 2000. Molecular marker-assisted introgression of the wild *Solanum commersonii* genome into the cultivated *S. tuberosum* gene pool. Theoretical and Applied Genetics. 102: 900-907.
- Barone, A.; Sebastiano, A.; Carputo, D. 1999. Chromosome pairing in *Solanum commersonii* – *S. tuberosum* sexual hybrids detected by *commersonii* specific RAPDs and cytological analysis. Genome. 42: 218–224.
- Barone, A.; Gebhardt, C.; Frusciante, L. 1995. Heterozygosity in 2n gametes of potato evaluated by RFLP markers. Theoretical and Applied Genetics. 91:98–104.
- Bradshaw, J.E. 2007. Potato-Breeding Strategy. In: Potato biology and biotechnology. Advances and perspectives. Vreugdenhil, D. (eds). Amsterdam, The Netherlands. Elsevier. pp 157- 177.
- Buding, K.Z. y Gavrilenko, T.A. 1994. Genetics bases of remote hybridization in potato. Russian Journal of Genetics. 30:1188-1196.
- Camadro, E. L.; Carputo, D.; Peloquin, S. J. 2004. Substitutes for genomic differentiation in tuber-bearing *Solanum*: interspecific pollen-pistil incompatibility, nuclear-cytoplasmic male sterility, and endosperm. Theoretical and Applied Genetics. 109: 1369-1376.

- Carmeille, A.; Caranta, C.; Dintinger, J.; Prior, P.; Luisetti, J.; Besse, P. 2006. Identification of QTLs for *Ralstonia solanacearum* race 3-phylo type II resistance in tomato. *Theoretical and Applied Genetics*. 113:110-21.
- Carputo, D.; Aversano, R.; Barone, A.; Di Matteo, A.; Iorizzo, M.; Sigillo, L.; Zoina, A.; Frusciante, L. 2009. Resistance to *Ralstonia solanacearum* of sexual hybrids between *Solanum commersonii* and *S. tuberosum*. *American Journal of Potato Research*. 86:196-202.
- Carputo, D.; Castaldi, L.; Caruso, I.; Aversano, R.; Monti, L.; Frusciante, L. 2007. Resistance to frost and tuber soft rot in near-pentaploid *Solanum tuberosum*-*S. commersonii* hybrids. *Breeding Science* 57:145-151.
- Carputo, D.; Barone, A.; Frusciante, L. 2000. 2n gametes in the potato: essential ingredients for breeding and germplasm transfer. *Theoretical and Applied Genetics*. 101: 805-813.
- Carputo, D.; Barone, A.; Cardi, T.; Sebastiano, A.; Frusciante, L.; Peloquin, S. 1997. Endosperm balance number manipulation for direct in vivo germplasm introgression to potato from a sexually isolate relative (*Solanum commersonii* Dun.). *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 94: 12013-12017.
- Chen, Y.K.H.; Palta, J.P.; Bamberg, J.B. 1999. Freezing tolerance and tuber production in selfed and backcross progenies derived from somatic hybrids between *S. Tuberosum* L and *S. commersonii* Dun. *Theoretical and Applied Genetics* 99: 100-107.
- CIP (Centro Internacional de la Papa). 2009. Potato. <http://www.cipotato.org/potato/>. Accedido en 2009.
- CIP (Centro Internacional de la Papa). 2007. Potato Bacterial wilt. http://www.cipotato.org/potato/pests_diseases/bacterial_wilt/. Accedido en 2007.
- Cook, D.; Sequeira, L. 1994. Strain differentiation of *Pseudomonas solanacearum* by molecular genetics methods. In: *Bacterial Wilt: the disease and its causative agent, Pseudomonas solanacearum*. Hayward, A.C. y Hartman, G.L. eds. Wallingford, WK. CAB International. pp 77-93.

- Correll, D.S. (ed). 1962. The potato and its wild relatives. Contributions from the Texas Research Foundation, Botanical Studies 4, 517p.
- Dodds, K.S. 1962. In: Correll, D.S. ed. The potato and its wild relatives. Contributions from the Texas Research Foundation, Botanical Studies 4, 517p.
- Ehlenfeldt, M.K. y Hanneman, R.J. 1988. Genetic control of endosperm balance number (EBN): three additive loci in a threshold-like system. Theoretical and Applied Genetics. 75:825-832.
- Fegan, M. y Prior, P. 2005. How Complex is the "*Ralstonia solanacearum* Species Complex"? In: Bacterial wilt disease and the *Ralstonia solanacearum* species complex. Allen, C.; Prior, P.; Hayward, A.C. eds. Minnesota, USA. APS Press. pp 449-462.
- French, E.R. y De Lindo, L. 1982. Resistance to *Pseudomonas solanacearum* in potato: specificity and temperature sensitivity. Phytopathology. 72:1408-1412.
- Galván, G.; Franco Fraguas, L.; Quirici, L.; Santos, C.; Silvera, E.; Siri, M. I.; Villanueva, P.; Raudiviniche, L.; González, M.; Torres, D.; Castillo, A.; Dalla Rizza, M.; Vilaró, F.; Gepp, V.; Ferreira, F.; Pianzola, M. J. 2006. *Solanum commersonii*: una especie con gran potencial para el mejoramiento genético de papa por resistencia a *Ralstonia solanacearum*. In: Avances de investigación en recursos genéticos en el cono sur II. Procisur, IICA. Uruguay. p. 87-102.
- Grun, P. 1990. The evolution of cultivated potato. Economic Botany 44 (Suppl. 3):39-55.
- Grun, P. 1979. The Evolution of cultivated potato: a cytoplasmic analysis. En: Hawkes, J.G.; Lester, R.N.; y Skelding, A.D. ed. The biology and taxonomy of the *Solanaceae*. Academic Press, London. pp 655-665.
- Hanneman, R.E. 1994. Assignment of Endosperm Balance Numbers to the tuber-bearing *Solanums* and their close non-tuber-bearing relatives. Euphytica 74:19-25.

- Hawkes, J. G. 1994. Origin of the cultivated potato and species relationship. En: Potato Genetics. Bradshaw J.E.; Mackay G.R. ed. Wallingford, UK. CAB International. pp 3-42.
- Hawkes, J.G. 1990. The potato: evolution diversity and genetic resources. Belhaven Press, London. 259p.
- Hayward, A.C. 1991. Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. Annual Review of Phytopathology. 29: 65-87.
- Hermesen, J. G. 1994. Introgression of Genes from Wild Species, Including Molecular and Cellular Approaches. In: Potato Genetics. Bradshaw J.E. y Mackay G.R. ed. Wallingford, UK. CAB International. pp 515-538.
- Hijmans, R. y Spooner, D. M. 2001. Geographic distribution of wild potato species. American Journal of Botany. 88:2101-2112.
- Huamán, Z. y Spooner, D. M. 2002. Reclassification of landrace populations of cultivated potatoes (*Solanum* sect. *Petota*). American Journal of Botany. 89: 947-965.
- Jackson, S.A y Hanneman Jr, R.E. 1999. Crossability between cultivated and wild tuber-and-non-tuber-bearing *Solanums*. Euphytica. 109:51-67.
- Jansky, S. 2006. Overcoming hybridization barriers in potato. Plant Breeding. 125:1-12.
- Johnston, S.A.; Hanneman, R.E. 1982. Manipulations of endosperm balance number overcome crossing barriers between diploid *Solanum* species. Science. 217: 446-448.
- Johnston, S.A.; den Nijs, T.P.N.; Peloquin, S.J.; Hanneman, R.E.1980. The significance of genic balance to endosperm development in interspecific crosses. Theoretical and Applied Genetics. 57: 5-9.
- Kim-Lee, H.; Moon, J. S.; Hong, Y. S.; Kim, M. S.; Cho, H. M. 2004. Bacterial wilt resistance in the progenies of the fusion hybrids between haploid of

- potato and *Solanum commersonii*. American Journal of Potato Research. 82:129-137.
- Laferriere, L.T.; Helgeson, J.P.; Allen, C. 1999. Fertile *S. tuberosum* + *S. commersonii* somatic hybrids as sources of resistance to bacterial wilt caused by *R. solanacearum*. Theoretical and Applied Genetics. 98:1272-1278.
- Masuelli, R. W.; Camadro, E. L.; Mendiburu, A. O. 1992. 2n gametes in *Solanum commersonii* and cytological mechanisms of triplandroid formation in triploid hybrids of *Solanum commersonii* x *Solanum gourlayi*. Genome. 35: 864-869.
- McCullagh, R.; Nelder, J.A. 1989. Generalized linear models (2nd Ed.). Monographs on statistics and applied probability, 37. Chapman and Hall, London. 511p.
- MGAP-DIEA (Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca - Dirección de Estadística Agropecuaria). 2009. Encuesta papera otoño 2009. <http://www.mgap.gub.uy/Diea/Encuestas/default.htm>. Accedido en 2009.
- MGAP-DIEA (Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca - Dirección de Estadística Agropecuaria).. 2002. Caracterización de la producción de papa- Encuesta 2002. <http://www.mgap.gub.uy/Diea/Encuestas/default.htm>. Accedido en 2006.
- Mok, D.W.S., Peloquin, S.J. 1975. Three mechanisms of 2n pollen formation in diploid potatoes. Canadian Journal of Genetic and Cytology. 17:217–225.
- Montanelli, C.; Chiari, A.; Chiari, T.; Stefanini, F.; Nascari, G. 1995. Evaluation of resistance to *Pseudomonas solanacearum* in potato under controlled conditions. Euphytica. 81:35-43.
- Murashige, T y Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum. 15: 473-497.
- Orrillo, M.; Bonierbale, M.; Priou, S.; Gutarra, L.; Aley, P.; Mihovilovich, E. 2009. Validando fuentes promisorias de resistencia a *Ralstonia solanacearum*.

- Primer Seminario Iberoamericano CYTED sobre *Ralstonia solanacearum*. Montevideo, Uruguay. 28 a 29 de mayo de 2009.
- Palta, J.P.; Simon, G. 1993. Breeding potential for improvement of freezing stress resistance: genetics separation of freezing tolerance, freezing avoidance, and capacity to cold acclimate. In: "Advances in Plant Cold Hardiness". Li, P.H.; Christersson, L. ed. Florida, USA. CRC Press. pp 239-310.
- Priou, S.; Aley, P.; Gutarra, L. 2005. Assessment of resistance to bacterial wilt in CIP advanced potato clones. In: Bacterial wilt disease and the *Ralstonia Solanacearum* species complex. Allen, C.; Prior, P; Hayward, A.C. eds. Minnesota, USA. APS Press. pp 261-268.
- Ramsey, J y Schemske, D.W. 1998. Pathways, mechanisms and rates of polyploid formation in flowering plants. Annual Review Ecology and Systematics. 29:467-501.
- Reddick, D. 1930. Frost-tolerant and blight-resistant potatoes. Phytopathology. 20: 987-991.
- Rowe, P. R. y Sequeira, L. 1970. Inheritance of resistance to *Pseudomonas solanacearum* in *Solanum phureja*. Phytopathology. 60: 1499-1502.
- Saddler, G.S. 2005. Management of bacterial wilt disease. In: Bacterial wilt disease and the *Ralstonia solanacearum* species complex. Allen, C.; Prior, P.; Hayward, A.C. ed. Minnesota, USA. APS Press. pp 121-132.
- Schmiediche, P. 1988. Breeding for resistance to *Pseudomonas solanacearum*. In: Report of the Planning Conference on Bacterial Diseases of the Potato in 1987. French, E.R. ed. Lima, Peru. International Potato Center. pp.19–28.
- Siri, M.I.; Galván, G.A.; Quirici, L.; Villanueva, P.; Ferreira, F.; Franco Fraguas, L.; Pianzola, M.J. 2009. Molecular marker diversity and bacterial wilt resistance in wild *Solanum commersonii* accessions from Uruguay. Euphytica 165: 371-382.
- Siri, M.I.; Elbaz, M.; Guidot, A.; Prior, P.; Genin, S.; Boucher, C.; M. J. Pianzola. 2007. Comparative genomic and pathogenic analysis between

- Ralstonia solanacearum* strains isolated in Uruguay. XIII Congress on Molecular Plant – Microbe Interactions. 21 -27 de julio. Sorrento, Italia. pp232.
- Siri, M.I.; Villanueva, P.; Quirici, L.; Silvera, E.; Franco-Fraguas, L.; Galván, G.; Vilaró, F.; Ferreira, F. y Pianzola, M. 2004. Caracterización de aislamientos de *Ralstonia solanacearum* en Uruguay e implementación de herramientas moleculares para su detección a partir de muestras de suelo y tubérculos. [en línea]. 14 de junio de 2009. <http://www.uach.cl/alap2004>.
- Spooner, D.M. y Hijmans, R.J. 2001. Potato systematics and germplasm collecting. 1989-2000. American Journal of Potato Research. 78: 237-268.
- Tam, T.R. y Hawkes, J.G. 1986. Cytogenetic studies and the occurrence of triploidy in the wild potato species *Solanum commersonii* Dun. Euphytica. 35: 293-302.
- Thurston, H, D. y Lozano, J. C. 1968. Resistance to bacterial wilt of potatoes in Colombian clones of *Solanum phureja*. American Potato Journal. 45:51-55.
- Tung, P. X; Rasco, E. T. Jr; Van der Zaag, P.; Schmiediche, P. 1990a. Resistance to *Pseudomonas solanacearum* in the potato. II : Aspects of host-pathogen-environment interaction. Euphytica. 45: 211-215.
- Tung, P. X; Rasco, E. T. Jr; Van der Zaag, P.; Schmiediche, P. 1990b. Resistance to *Pseudomonas solanacearum* in the potato. I : Effects of sources of resistance and adaptation. Euphytica. 45: 203-210.
- Van den Berg, R.G.; Jacobs, M. 2007. Molecular taxonomy. In: Potato biology and biotechnology. Advances and perspectives. Vreugdenhil, D. ed. Oxford, UK. Elsevier. pp 55-76.
- Walker, T. y Collion, M. H., 1998. Priority setting at CIP for the 1998-2000 Medium Term Plan. International Potato Center. Lima, Perú. 48p
- Watanabe, J.A.; El-Nashaar, H.M.; Iwanaga, M. 1992. Transmission of bacterial wilt resistance by first division restitution (FDR) 2n pollen via 4x2x crosses in potatoes. Euphytica. 60:21–26.

- Watanabe, K. y Peloquin, S.J. 1991. The occurrence and frequency of 2n pollen in 2x, 4x, and 6x wild tuber-bearing *Solanum* species from Mexico, and Central and South America. *Theoretical and Applied Genetics*. 82:621–626.
- Watanabe, K. N.; Peloquin, S.T. 1989. The occurrence and frequency of 2n pollen in 2x, 4x, and 6x wild, tuber-bearing *Solanum* species from Mexico, and Central and South America. *Theoretical and Applied Genetics*. 82: 621-626.
- Werner, J.E. y Peloquin, S.J. 1987. Frequency and mechanisms of 2n egg formation in haploid tuberosum-wild species F1 hybrids. *American Potato Journal*. 64:641–654.
- Yang, W. y Francis, D. M. 2007. Genetics and breeding for resistance to bacterial diseases in tomato: prospects for marker-assisted selection. In: *Genetic improvement of Solanaceous crops (Volume 2: Tomato)*. Razdan, M.K. ; Mattoo, A.K. eds. 2007 Enfield, USA. Science Publishers. pp 379-419.
- Zimnoch-Guzowska, E. ; Lojkowska, E.; Pérombelon, M. 2005. Resistance to bacterial pathogens. In : *Genetic improvement of Solanaceous crops (Volume 1: Potato)*. Razdan, M.K. ; Mattoo, A.K. eds. 2005. Enfield, USA. Science Publishers. pp 339–395.