

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE AGRONOMÍA

**USO DE *SOLANUM COMMERSONII* Dun. EN EL
MEJORAMIENTO GENÉTICO DE PAPA PARA RESISTENCIA
A *RALSTONIA SOLANACEARUM*: caracterización de una
retrocruza 3**

por

Mariana ANDINO ROSSI

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

MONTEVIDEO
URUGUAY
octubre de 2017

Tesis aprobada por el tribunal integrado por la Dra. Elsa Camadro, la Dra. María Inés Siri y M.Sc. Paola Gaiero el 25 de octubre de 2017.

Autora: Ing. Agr. Mariana Andino.

Director Dr. Pablo Speranza y Co-director Dr. Francisco Vilaró.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo de investigación fue apoyado por: Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII) y el Departamento de Biología Vegetal de la Facultad de Agronomía de la Universidad de la República (Udelar).

Agradezco a la Lic. Cristina Mazzela, Lic. Magdalena Vaio y al personal del Laboratorio de Evolución y Domesticación de Plantas de la Facultad de Agronomía - Udelar por el apoyo permanente, paciencia y valiosas sugerencias. Al Ing. Agr Pablo Sandro, Sr. Matías Antuoni y Julio Esburlatti por su ayuda durante el desarrollo del trabajo de campo y procesamiento de datos. A la Ing. Agr Alicia Castillo, Ing. Agr. Victoria Bonecarrere y al personal técnico del INIA y al Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Química - Udelar por la buena provisión de material vegetal y la preparación de inoculaciones. También quiero agradecer a Dra. Elsa Camadro por sus útiles aportes a este trabajo.

Al Ing. Agr Guillermo Galván por su orientación académica durante el desarrollo de la Mestría. Al Ing. Agr. Francisco Vilaró por su colaboración y enseñanzas respecto a este cultivo, a la Lic Paola Gaiero por su constante y valiosa contribución a este proyecto de estudio y al Ing Agr Pablo Speranza por su permanente apoyo y enseñanzas durante el transcurso de este trabajo.

TABLA DE CONTENIDOS

PÁGINA DE APROBACIÓN.....	II
AGRADECIMIENTOS.....	III
RESUMEN.....	VI
SUMMARY.....	VII
1. <u>INTRODUCCIÓN</u>	1
1.1 LA DOMESTICACIÓN DE LA PAPA Y SUS IMPLICANCIAS ACTUALES	1
1.2 MEJORAMIENTO GENÉTICO POR INTROGRESIÓN DE GENES MEDIANTE CRUZAMIENTO CON ESPECIES EMPARENTADAS ..	3
1.3 SITUACIÓN DE LA PAPA EN URUGUAY	6
1.4 LA MARCHITEZ BACTERIANA	7
1.5 <i>SOLANUM COMMERSONII</i> DUN. COMO RECURSO GENÉTICO PARA EL MEJORAMIENTO DE PAPA	10
1.6 HIPÓTESIS PLANTEADAS	15
1.7 OBJETIVOS	15
2. <u>POTATO INTROGRESSIVE HYBRIDIZATION BREEDING FOR BACTERIAL WILT RESISTANCE USING <i>SOLANUM COMMERSONII</i> DUN. AS DONOR: GENETIC AND AGRONOMIC CHARACTERIZATION OF A BACKCROSS 3 PROGENY</u>	17
2.1 ABSTRACT	17
2.2 INTRODUCTION	19
2.3 MATERIALS AND METHODS	22
<u>2.3.1 Plant material</u>	22
<u>2.3.2 Resistance assays</u>	22
<u>2.3.3 Chromosome counts</u>	23
<u>2.3.4 Field trials for morphological and agronomic traits</u>	23
<u>2.3.5 Pollen stainability</u>	24

2.3.6 <u>Data analysis</u>	24
2.4 RESULTS	25
2.4.1 <u>Resistance to <i>R. solanacearum</i></u>	25
2.4.2 <u>Chromosome segregation</u>	26
2.4.3 <u>Morphological, agronomical and reproductive characterization</u>	27
2.4.4 <u>Chromosome number and other characters</u>	31
2.5 DISCUSSION	32
2.5.1 <u>Resistance to <i>R. solanacearum</i></u>	32
2.5.2 <u>Chromosome number</u>	33
2.5.3 <u>Segregation for morphologic and agronomic characters</u>	34
2.5.4 <u>Agronomic performance</u>	34
2.5.5 <u>Pollen fertility</u>	35
2.5.6 <u>Chromosome number and performance</u>	36
2.6 CONCLUSIONS	37
2.7 REFERENCES	39
2.8 ANNEXES	47
3. <u>DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES GENERALES</u>	49
4. <u>BIBLIOGRAFÍA</u>	54

RESUMEN

La Marchitez bacteriana causada por *Ralstonia solanacearum* es una de las principales enfermedades que afecta el cultivo de la papa *Solanum tuberosum* L. subsp. *tuberosum* (tbr; $2n = 4x = 48$, 4 NBE). *Solanum commersonii* Dun. (cmm; $2n = 2x = 24$; 1 NBE), una solanácea nativa de Uruguay, posee varias características deseables para el mejoramiento del cultivo de papa como es la resistencia a dicho patógeno. En Uruguay, el Instituto de Investigación Agropecuaria (INIA) ha llevado a cabo cruzamientos exitosos cmm x tbr con este objetivo, dando lugar luego a sucesivas progenies de retrocruzas 1, 2 y 3 con ploidías, niveles de resistencia a la enfermedad, características morfológicas y agronómicas variables. El objetivo de este estudio fue analizar la resistencia a *R. solanacearum* de una progenie de una tercer retrocruza con papa (RC₃), realizar la caracterización citogenética, reproductiva, morfológica y agronómica a fin de evaluar el efecto de la ploidía de los individuos y definir estrategias para futuros cruzamientos. En un total de 65 plantas evaluadas, la resistencia a *R. solanacearum* mostró un patrón de segregación transgresiva. El 52% de dichas plantas tuvieron entre 47 y 49 cromosomas, acercándose por lo tanto a la ploidía de tbr. Todas ellas fueron machoestériles, lo que se explicaría por la interacción entre genes nucleares de una especie con genes citoplasmáticos de la otra. Aunque se observó amplia segregación en los caracteres morfológicos, las plantas analizadas mostraron semejanza con los padres recurrentes (tbr). La relación negativa encontrada entre el número de cromosomas extras y el desempeño agronómico, posiblemente sea debido a la presencia de cromosomas del genoma silvestre en estos híbridos. Sería necesario continuar las retrocruzas para eliminar las características de *S. commersonii* que aún permanecen. Asimismo, la presencia de individuos con ploidías cercanas a $2x = 48$, morfológicamente similares a tbr, con buenos niveles de resistencia a *R. solanacearum*, sugiere la ocurrencia de eventos de introgresión, señalando a *S. commersonii* como uno de los recursos genéticos más prometedores para el mejoramiento de papa.

Palabras clave: *Ralstonia solanacearum*, papas silvestres y cultivada, resistencia, mejoramiento, aneuploidía.

SUMMARY

The use of *Solanum commersonii* Dun. to breed potatoes resistant to *Ralstonia solanacearum*: characterization of a backcross 3 progeny

Bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum* is one of the main diseases currently facing potato cultivation *Solanum tuberosum* L. subsp. *tuberosum* (tbr; $2n = 4x = 48$, 4 EBN). *Solanum commersonii* Dun. (cmm; $2n = 2x = 24$, 1 EBN) is a native solanaceous species from Uruguay, which has several desirable characteristics for the improvement of potato cultivation, such as resistance to *R. solanacearum*. In Uruguay successful crosses cmm x tbr have been carried out with this objective, resulting in successive backcross 1, 2 and 3 progenies with variable ploidy, resistance to bacterial wilt, morphology and agronomic performance. The aim of this study was to analyse the resistance to *R. solanacearum* in a backcross 3 (BC₃) progeny, to characterize the BC₃ individuals cytogenetically, reproductively, morphologically and agronomically, to evaluate the effect of the remaining aneuploidy and define a strategy for future breeding. Resistance to *R. solanacearum* showed a pattern of transgressive segregation. About 52% of individuals have ploidies near that of tbr. Due to a cytoplasm swap, all were male sterile. Although there is wide segregation in morphological characters, individuals tend to resemble the recurrent tbr parent. A strong relationship between the number of extra chromosomes and the wild genome content in these hybrids negatively affected their agronomic performance. More backcrosses may be necessary to incorporate desirable traits from cmm into tbr germplasm to remove undesirable characters from cmm. Likewise, the presence of individuals with ploidies close to $2x = 48$, morphologically resembling tbr with good levels of resistance suggests the occurrence of introgression events, pointing to *S. commersonii* as one of the most promising genetic resources for potato breeding.

Keywords: *Ralstonia solanacearum*, wild and cultivated potato, resistance, improvement, aneuploidy.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 LA DOMESTICACIÓN DE LA PAPA Y SUS IMPLICANCIAS ACTUALES

Las papas cultivadas (*Solanum tuberosum* L.) son el tercer cultivo alimenticio más importante del mundo, luego del trigo y el arroz. Originaria de Sud América, actualmente se produce en aproximadamente 149 países de todos los continentes. La producción anual es de 325 millones de toneladas (Birch *et al.*, 2012). Es el cultivo que más materia seca y proteína produce por hectárea y es considerado crítico en términos de seguridad alimentaria mundial (Bradeen y Haynes 2011, Birch *et al.* 2012).

Si bien la clasificación taxonómica de estas solanáceas que pertenecen al género *Solanum* sección *Petota* está en permanente revisión, se sabe que la papa cultivada de mayor importancia económica es el tetraploide tetrasómico *S. tuberosum* L. (tbr; $2n = 4x = 48$, 4 NBE), conocido como *S. tuberosum* L. subsp. *tuberosum* (Hawkes, 1990), o recientemente *S. tuberosum* L. grupo *Tuberosum* o *Chilotanum* (Spooner *et al.*, 2007). Se trata de una planta herbácea, de ciclo anual cuya duración puede variar entre los 75 y 180 días, que puede crecer desde los 65° de latitud norte hasta los 50° de latitud sur. Se puede multiplicar tanto sexualmente, por semilla sexual, como por reproducción vegetativa a través de estolones o de los tubérculos que son, a su vez, los órganos de consumo humano. Si bien es originaria de las zonas templadas, los cultivares actuales de papa presentan cierta adaptabilidad a diferentes ambientes, aunque la producción de los tubérculos puede verse limitada por factores ambientales como temperaturas por encima de 21° C o debajo de 5° C, heladas y déficit hídrico (Bradshaw y Bonierbale, 2010).

Según datos arqueológicos, la domesticación de la papa comenzó hace alrededor de 8000 años, en la zona del lago Titicaca, en el límite entre Bolivia y Perú. En el siglo XVI fue introducida a Europa y desde allí se extendió al resto del mundo. Los actuales cultivares modernos, son producto de un continuo y tradicional esquema de cruzamientos y selección entre parentales con caracteres complementarios dentro de tbr,

generados a partir de los pocos clones que 400 años atrás llegaron a Europa o posteriormente a Norteamérica. En los diferentes programas de mejoramiento de papa se han realizado introgresiones con otras especies cultivadas y silvestres, teniendo muchos de los cultivares, principalmente los europeos, presencia de germoplasma silvestre, usado como fuente para conferir resistencia a plagas y enfermedades (Bradshaw y Bonierbale 2010, Bradeen y Haynes, 2011). A pesar de esto, se considera que en general, la base genética del cultivo es estrecha ya que en comparación con la gran diversidad existente dentro del género *Solanum*, el número de especies utilizadas en el mejoramiento, particularmente de las sudamericanas, es reducido (Bradshaw and Bonierbale, 2010).

Los cultivares modernos de papa son altamente eficientes en transformar fotoasimilados en materia seca, obteniéndose en condiciones no limitantes de nutrientes, agua y en ausencia de plagas o enfermedades, índices de partición de hasta 80 %, pero este rendimiento no es alcanzado en la práctica (Bradshaw 2009). La poca variabilidad genética existente entre ellos, sumado a que sólo unos pocos clones son los realmente cultivados alrededor del mundo, generalmente bajo la modalidad de monocultivo, hace a la producción muy vulnerable a situaciones de estreses bióticos y abióticos, lo cual repercute negativamente en el rendimiento (Grun 1990, Hawkes 1990, Bradshaw 2009, Spooner *et al.* 2014).

En la actualidad, la producción mundial de papa está estancada (FAO 2012 citado por Birch *et al.*, 2012). En vista del aumento de la demanda de alimentos como consecuencia del incremento de la población del planeta en los años venideros, de la incertidumbre frente al cambio climático y su efecto sobre la producción y sobre plagas y enfermedades (Birch *et al.*, 2012), se hace necesario disminuir las pérdidas de rendimiento, extender a otras áreas el cultivo y lograr una forma de producción más sustentable, tanto económica como ambientalmente (Bradshaw 2009, Patil *et al.* 2012).

Es por esto que los diferentes programas de mejoramiento a nivel mundial han puesto especial énfasis en ampliar la base genética del cultivo mediante la incorporación de

germoplasma de los parientes silvestres, a fin de lograr cultivares más adaptables a situaciones locales o regionales de producción (Camadro *et al.* 1998, Bedonni y Camadro 2009, Bradshaw *et al.* 2006, Bradshaw 2009, Birch *et al.* 2012, Carputo *et al.* 2009, Spooner *et al.* 2014).

1.2 MEJORAMIENTO GENÉTICO POR INTROGRESIÓN DE GENES MEDIANTE CRUZAMIENTO CON ESPECIES EMPARENTADAS

Actualmente el mejoramiento genético de tbr por introgresión de genes mediante cruzamientos con especies emparentadas es una vía para levantar las limitantes productivas del cultivo. Este tipo de mejoramiento es favorecido por la gran diversidad de germoplasma existente, tanto silvestre como cultivado, en diferentes zonas de América del Sur y Centroamérica (Bradshaw *et al.* 2006, Bradshaw 2009).

Se reconocen alrededor de 200 especies tuberosas dentro de la sección *Petota* del género *Solanum*, adaptadas a crecer en un amplio rango geográfico y de ecosistemas (Bradeen y Hayles 2011, Spooner *et al.* 2014), con características muy deseables para el cultivo comercial como resistencias a plagas y enfermedades, adaptación al frío y a la sequía, diferentes ciclos de tuberización y dormición, forma y color de tubérculos, muy altos contenidos de materia seca y calidad para chips (Hanneman 1989, Carputo *et al.* 2000). Aunque todas potencialmente podrían usarse en el mejoramiento, la introgresión de genes favorables a través de cruzamientos interespecíficos se ve muchas veces en dificultades dadas las barreras a la hibridación, tanto pre como post cigóticas, existentes con tbr (Jansky, 2006).

Una de las barreras a la hibridación precigóticas más frecuente, que puede darse entre estas especies, es la incompatibilidad entre el polen y el pistilo. En 1981 Camadro y Peloquin, proponen un modelo basado en genes dominantes CI presentes en el estilo que previenen la fertilización de los granos de polen que portan los genes dominantes complementarios (Camadro *et al.*, 2004 y 2011). Si el cruzamiento es compatible en este nivel y ocurre la fecundación, se pueden manifestar las barreras poscigóticas, como la barrera del endosperma. Esta es explicada por Johnston *et al.* (1980) a

través de la Teoría del Número de Balance del Endosperma o NBE o ploidía efectiva. Esta teoría postula que dentro de las solanáceas tuberíferas del género *Solanum*, cada especie o citotipo tiene, además de su ploidía real dada por el número cromosómico, una ploidía “efectiva” determinada por factores genéticos cualitativos (NBE), la cual no es necesariamente un reflejo de la ploidía real. El valor de NBE asignado para cada una de estas especies o citotipos, calculado en base a cruzamientos controlados con una especie estándar, puede ser 1, 2 o 4 (Johnston y Hanneman 1980, Hanneman 1994). Para que un cruzamiento sea exitoso y la semilla sea viable, la relación entre los factores genéticos que aportan los gametos del progenitor femenino y del masculino en el endosperma del híbrido, debe ser de 2:1, de lo contrario dicho endosperma degenera y el embrión muere. Para que esta relación ocurra, ambos progenitores deben tener igual valor de NBE, situación que generalmente no se cumple entre el tetraploide *S. tuberosum* subsp. *tuberosum* (NBE = 4) y los genotipos silvestres, mayoritariamente diploides o triploides con NBE de 1 o 2.

Aunque el valor del NBE no necesariamente coincide con la ploidía real de la especie, este puede modificarse si se cambia la misma. Es por esto que la manipulación de la ploidía ha sido una vía para superar la barrera del NBE y alcanzar el éxito en cruzamientos entre papa y especies emparentadas de menor NBE, generando híbridos viables que pueden, a su vez, retrocruzarse con la papa (Johnston *et al.* 1980, Carputo *et al.* 1997 y 2000, Bradshaw y Bonierbale 2010). Otra forma de sortear esta barrera postcigótica en cruzamientos de interés entre especies de diferente NBE, es que la especie de menor NBE produzca gametos con número cromosómico no reducido. La producción de este tipo de gametos es una característica natural de muchas solanáceas de la sección *Petota*, explicada por una serie de anomalías que afectan la meiosis (Peloquin *et al.*, 1989). Los gametos no reducidos permiten no sólo la incorporación de genes de interés, sino también aumentar la diversidad alélica, maximizando así la heterosis en tbr (Peloquin *et al.* 1989, Carputo *et al.* 2000, Carputo y Frusciante 2011).

Una vez superadas las barreras a la hibridación, para que efectivamente los genes de interés proveniente de las especies silvestres sean introgresados al genoma de la pa-

pa, deberá darse el apareamiento y el intercambio de cromatina entre los cromosomas de ambas especies durante la meiosis de los híbridos generados, circunstancia que estará definida por el grado de homeología existente entre ellos (Barone *et al.*, 1999) Según Matsubayashi (1991), todas las especies tuberosas del género *Solanum* independientemente de su nivel de ploidía, poseen un genoma común llamado genoma A. Este genoma, conocido como genoma base, se fue modificando hasta derivar en 5 genomas reconocidos: A, B, C, D y E aunque no se han encontrado fuertes evidencias sobre diferenciación cromosómica importante entre las especies del género *Solanum* sección Petota. Por este motivo se postula una escasa diferenciación genómica entre las mismas (Camadro *et al.*, 2004) lo que hace pensar que el apareamiento y recombinación génica entre cromosomas homeólogos sea posible en híbridos interespecíficos dentro del grupo (Barone *et al.*, 1999)

Otro de los problemas que pueden surgir al cruzar especies con diferente ploidía es que se generen individuos con complementos cromosómicos desbalanceados (aneuploides). Dependiendo del grado de desbalance génico y de los genes que estén en dosis mayores o menores a las esperadas en euploidía estos individuos pueden presentar diferentes disfunciones fisiológicas debido al aumento de la expresión de genes relacionados con la respuesta al estrés (Sheltzer *et al.* 2012).

En los esquemas de mejoramiento clásicos basados en la introgresión de genes, las etapas de hibridación son seguidas por una serie de cruzamientos o retrocruzamientos con papa (progenitor recurrente), seleccionando al fin de cada etapa los individuos con características deseables que pasarán a la siguiente generación de retrocruza. Este procedimiento tiene como objetivo ir “eliminando” parte del genoma silvestre (progenitor donante), que puede estar confiriendo caracteres desfavorables para el cultivo. Así, al fin del proceso se espera obtener genotipos casi isogénicos con el padre recurrente. Hoy en día, técnicas moleculares como la selección asistida por marcadores son una herramienta que ha tenido gran impacto en las diferentes etapas del mejoramiento por introgresión, permitiendo maximizar la eficiencia del proceso (Hermsen, 1994).

1.3 SITUACIÓN DE LA PAPA EN URUGUAY

La papa en Uruguay, con 4.250 hectáreas plantadas al año y un volumen de producción de aproximadamente 71.825 toneladas, es el principal cultivo hortícola del país (MGAP-DIEA, 2015). Se estima que 64% de la producción se destina a cubrir la demanda interna de consumo en fresco y el restante 36% se utiliza como tubérculos “semilla” en las plantaciones siguientes. La producción de papa se ha caracterizado por estar regionalizada en el territorio nacional, dadas las condiciones edáficas y climáticas favorables al cultivo. La zona sur concentra 90 % del área, seguida por la zona este (25%) y la zona norte (1%). Se caracteriza además por ser un cultivo muy intensivo en cuanto al uso del suelo, agua e insumos agrícolas. Se estima que 60% de la producción está en manos de 12 grandes productores, que son dueños o arriendan los campos donde se cultiva la papa zafra tras zafra (MGAP-DIEA, 2015). En cuanto a los cultivares, se destaca una fuerte predominancia de los extranjeros de piel rojiza como Chieftain, que abarca 46% del área sembrada, seguida por Red Pontiac (24%) y Rudolph (8%), que tienen buen rendimiento productivo y sobre todo gran aceptación en el mercado de consumo local (MGAP-DIEA, 2015).

Este sistema de producción altamente dependiente de cultivares extranjeros es vulnerable, principalmente a plagas y enfermedades locales. La incidencia de plagas y enfermedades se ve potenciada por la forma de llevar a cabo el cultivo y las condiciones ambientales favorables de algunos años, donde las temperaturas medias son mayores al igual que las lluvias (Galván *et al.* 2006, González 2010, Sanabria *et al.* 2012). Uno de los problemas que preocupa al sector productivo es la marchitez bacteriana de la papa o murchera, enfermedad de creciente incidencia mundial (Patil *et al.*, 2012) y presente en nuestro país, para la cual los cultivares plantados son susceptibles (González *et al.*, 2013).

En este marco, el Programa de Mejoramiento Genético Vegetal de INIA, con apoyo de la Universidad de la República y otras instituciones públicas y privadas, viene trabajando en el desarrollo de alternativas tecnológicas que posibiliten sistemas productivos más sustentables para el país. Contar con cultivares de papa nacionales re-

sistentes a plagas y enfermedades locales como la marchera, de alto valor agronómico, adaptados a las condiciones agroecológicas y de manejo es uno de los principales desafíos del Programa, ya que permitiría aumentar el rendimiento y calidad del producto, bajar los costos de producción, disminuir el impacto ambiental negativo causado por la aplicación de agroquímicos, así como cuidar la salud de trabajadores y consumidores.

1.4 LA MARCHITEZ BACTERIANA

La marchitez bacteriana o marchera, es la principal enfermedad bacteriana en importancia económica que afecta la producción de papa alrededor del mundo (Fernández *et al.*, 2015). Esta enfermedad, que provoca pérdidas devastadoras y que incluso puede limitar la producción en zonas cálidas y templadas, está causada por *Ralstonia solanacearum* (Smith 1896, Yabuuchi *et al.* 1996), un bacilo Gram negativo aerobio, que vive en el suelo y se introduce en la planta a través de heridas. Al alojarse y multiplicarse en los vasos del xilema, causa parcial o total obstrucción de los mismos, lo cual lleva al marchitamiento y muerte de la planta (Mwangi *et al.* 2008, Siri *et al.* 2011, Fernández *et al.* 2015). En muchos casos las plantas infectadas pueden no presentar síntomas y tener tubérculos infectados, que son fuente de nuevas infecciones si se los usa como “semilla” (Mwangi *et al.*, 2008).

Ralstonia solanacearum se reconoce como un complejo de especies de gran distribución geográfica, con amplio rango de hospederos además de solanáceas, con diferencias en el grado de virulencia y en los modos de transmisión (Hayward, 1991). Tradicionalmente, este patógeno se clasificó en cinco razas basadas en sus hospederos y en siete biovars por sus propiedades bioquímicas. Esta clasificación previa a la disponibilidad de herramientas moleculares, no fue del todo práctica porque resultaba poco predictiva con algunos grupos muy variables (Buddenhagen 1986 y Hayward 1994 citados por Patil *et al.* 2012). Fegan y Prior (2005) clasificaron a *R. solanacearum* en cuatro filotipos que reflejan su origen geográfico y secuevars según la secuencia del gen que codifica para la endoglucanasa (Siri *et al.* 2011, Patil *et al.* 2012). La revisión taxonómica más reciente realizada por Safni *et al.* (2014) restrin-

ge *R. solanacearum* a las cepas del filotipo II originarias de Sudamérica, mientras que los filotipos I y III se agruparon en una nueva especie, *R. pseudosolanacearum*, y el filotipo IV fue reclasificado como *R. syzygii*. En papa la enfermedad es causada principalmente por la Raza 3 biovar 2 (R3 bv2) o Filotipo II secuevar 1, según uno u otro criterio de clasificación (Siri *et al.* 2011, Patil *et al.* 2012, Fernández *et al.* 2015).

Se estima que las hectáreas anuales del cultivo afectadas por esta enfermedad a nivel mundial están en el entorno de 1.53 millones y las pérdidas de producción directas, dependiendo de las condiciones ambientales, cultivar y severidad de la cepa, están entre 33% y 90%, con un daño global de aproximadamente 950 millones de dólares americanos anuales (Patil *et al.* 2012, Yuliar *et al.* 2015). A estas pérdidas directas de rendimiento, se suman las pérdidas en almacenamiento por pudrición de tubérculos o el impedimento de usarlos como semilla, así como la inhabilitación de suelos infectados para futuras plantaciones del cultivo (Sanabria *et al.* 2012, Fernández *et al.* 2015).

Las estrategias de control cultural de la enfermedad han sido objeto de investigaciones llevadas a cabo durante décadas, sin mayores resultados (Patil *et al.*, 2012). Se trata de una bacteria que tiene amplio rango de hospederos y amplia distribución geográfica, así como alta capacidad de sobrevivencia en el suelo, agua, tubérculos y plantas asintomáticas. En Uruguay, estudios realizados por Sanabria *et al.* (2012) revelaron que se encuentran aislamientos infectivos en suelo luego de 10 años de la infección previa. Por este motivo, las formas de control cultural como rotaciones con otros cultivos, no han brindado grandes soluciones al problema (Sanabria *et al.* 2012, Patil *et al.* 2012, Zuluaga *et al.* 2014). Tampoco recomendaciones como limpieza de maquinaria y herramientas, esterilizaciones o fumigaciones químicas del suelo han dado resultados a la hora de detener o erradicar la enfermedad. Los tratamientos con bactericidas en los cultivos no han tenido gran éxito, con el agravante que elevan el costo de producción y son poco amigables con el ambiente y la salud humana (Patil *et al.*, 2012).

Si bien existen algunos cultivares de papa con resistencia a la enfermedad, muchas veces no son adoptados por problemas productivos o de adaptación a los sistemas de cultivo (Patil *et al.*, 2012). Para otras especies de papa cultivada, como por ejemplo *S. phureja*, se dispone de cultivares con resistencia; sin embargo, se ha observado que ésta se quiebra con el aumento de la temperatura, por lo que su uso con este fin es limitado (Tung *et al.*, 2006).

En Uruguay el primer brote de la enfermedad se registró en 1974, con pérdidas cercanas a 90% de la producción papera (Siri *et al.*, 2011). Todas las cepas encontradas infectando este cultivo corresponden a la Raza 3 biovar 2 en la clasificación funcional tradicional, y al filotipo IIB, sequevar 1 (IIB-1) en la clasificación molecular actual (Siri *et al.*, 2011). La diversidad genética de las cepas es escasa, pero las mismas presentan diferencias en cuanto a la agresividad sobre el cultivo, siendo la cepa UY031 una de las identificadas como agresiva (Siri *et al.* 2009 y 2011, Guarischi Sousa *et al.* 2016). Actualmente, los cultivares que mayoritariamente se cultivan en Uruguay, como Chieftain, son susceptibles a la enfermedad y la incidencia de la misma es alternante, dependiendo de las condiciones climáticas y prácticas de cultivo, con pérdidas que rondan entre 5 y 34% (Galván *et al.* 2006, MGAP-DIEA 2003 citado por Sanabria *et al.* 2012). Por otra parte, la enfermedad ha sido reportada en todo el territorio nacional, no existiendo regiones libres del patógeno. El control cultural preventivo se basa en el uso de tubérculos “semilla” sanos en suelos sin antecedentes del cultivo o de la enfermedad. Estas zonas de menor presión de inóculo en el suelo son utilizadas para producir “papa semilla” certificada, siendo cero la tolerancia para presencia del patógeno establecida en los estándares de producción (MGAP citado por Siri *et al.* 2011). De allí que contar con cultivares con resistencia durable a la enfermedad, adaptados a los diferentes climas y formas de manejo del cultivo, es la alternativa más efectiva, económica y amigable con el ambiente. Es por esto que el mejoramiento por resistencia a *R. solanacearum* está concentrando los mayores esfuerzos alrededor del mundo, dada la gran importancia económica de la papa, y Uruguay no es ajeno a esto.

1.5 *Solanum commersonii* Dun. COMO RECURSO GENÉTICO PARA EL MEJORAMIENTO DE PAPA

Solanum commersonii Dun. (Hawkes, 1994) (cmm; $2n = x = 24$, NBE = 1) es una solanácea tuberosa emparentada con la papa cuyo centro de origen y diversidad primario se extiende por el Sur de Brasil, Uruguay, las provincias argentinas del litoral del Río Uruguay hasta el sur de la provincia de Buenos Aires (Correll, 1962). Se trata de una especie diploide, aunque se han encontrado citotipos $3x$ (Hawkes, 1994). Crece en diversos ambientes, desde dunas a praderas o serranías, y desde la costa hasta los 400 m sobre el nivel del mar (Prieto *et al.*, 2016). Algunos autores como Correll (1962) reconocen dos subespecies, *S. commersonii* subsp. *commersonii* y *S. commersonii* subsp. *malmeanum*. A la primera, que crece espontáneamente en Uruguay, le corresponde el fenotipo morfológico de planta pequeña, semi-arrosetada o erecta, con hojas compuestas, en las que se destaca el mayor tamaño del folíolo terminal en comparación con los laterales. Produce inflorescencias muy compactas con varias flores estrelladas de coloraciones violáceas a blanquecinas que surgen del mismo punto. Las plantas florecen desde febrero a junio, y se caracterizan por generar largos estolones que terminan en pequeños tubérculos de 2-5 cm de diámetro (Correll 1962, Hawkes 1994, Clausen *et al.* 2005).

Desde hace varias décadas y a nivel mundial, *S. commersonii* es considerada una especie de gran potencial para el mejoramiento genético de la papa cultivada por introgresión, dadas sus muchas características favorables como la tolerancia a bajas temperaturas y sequía (Chen *et al.* 1999, Iorizzo 2011), alto contenido de materia seca de los tubérculos y resistencia a varias plagas y enfermedades como: *Ditylenchus destructor*, *Alternaria solani*, virus X e Y, *Phytophthora infestans*, *Pectobacterium carotovorum* y *R. solanacearum* (Chen *et al.* 1999, Laferriere *et al.* 1999, Micheletto *et al.* 2000).

Entre las características agronómicas menos deseables de *S. commersonii* se citan el mayor largo y persistencia de los estolones, el escaso tamaño de los tubérculos y un

alto contenido de glicoalcaloides en los mismos (Carputo *et al.* 2002, Galván *et al.* 2006).

Al ser de una especie diploide y tener un $NBE = 1$, otra de las limitantes para su uso en los programas de mejoramiento genético por introgresión, es la dificultad para el cruzamiento y generación de híbridos viables con tbr ($2n=4x$, 4 NBE), debido a la formación defectuosa del endosperma de la semilla (Johnston *et al.*, 1980). Esto ha hecho que se deba recurrir a diversas técnicas como generación de híbridos somáticos (Cardi *et al.* 1993, Laferriere *et al.* 1999), manipulación de la ploidía mediante duplicaciones cromosómicas, haploidizaciones, uso de gametos no reducidos, utilización de especies puente (Cardi *et al.* 1993, Carputo *et al.* 1995 y 1997) y rescate de embriones (Jansky, 2006) a fin de sortear dicha barrera. Debido a que *S. commersonii* frecuentemente produce gametos no reducidos, característica de suma importancia por la facilidad que brinda a la hora de realizar cruzamientos interespecíficos (González *et al.*, 2013), ha sido incorporada con éxito en diferentes programas de mejoramiento por introgresión de papa (Carputo *et al.* 2017, González *et al.* 2013).

Uruguay se encuentra en el centro de diversidad de *S. commersonii*. Desde hace varios años INIA, la Facultad de Agronomía y la Facultad de Química de la Universidad de la República, han recolectado y caracterizado clones en función de su resistencia a *R. solanacearum*, generando información muy útil a la hora del uso de estos recursos genéticos en el mejoramiento de papa. En trabajos de inoculación con diferentes cepas nacionales de *R. solanacearum* R₃ bv₂ se han detectado diferencias entre individuos en cuanto al nivel de resistencia (Galván *et al.* 2006, Siri *et al.* 2009 y 2011, González *et al.* 2013). En investigaciones más recientes, se han innovado técnicas para la detección de la enfermedad latente en plantas asintomáticas, lo que ha permitido detectar diferencias entre clones (Zuluaga *et al.* 2014, Ferreira *et al.* 2017). Estudios poblacionales han confirmado la existencia de citotipos $2n= 2x$ y $2n=3x$ dentro de las mismas poblaciones, y se han analizado la diversidad genética y los mecanismos de producción de gametos no reducidos (Siri *et al.* 2009, Silveira *et al.* en preparación). En cuanto al contenido de glicoalcaloides, también se han encontrado diferencias entre los clones recolectados (Vázquez *et al.*, 1997).

Carputo *et al.* (1997) plantearon un esquema de cruzamiento para la introgresión de resistencia a *E. carotovora* y *R. solanacearum* proveniente de *S. commersonii* en la papa cultivada, en el que se utilizan diversas técnicas para lograr la hibridación con tbr incluido el uso de gametos no reducidos producidos por *S. commersonii*. Una vez obtenido los híbridos interespecíficos, el esquema contempla una serie de retrocruzas con cultivares de papa a fin de ir eliminando los caracteres indeseables que pueda aportar el parental silvestre en cada generación (Fig 1).

En estos trabajos se observó cómo, efectivamente, los gametos no reducidos permitían concluir con éxito los cruzamientos interespecíficos y cómo, a medida que se avanzaba en las retrocruzas, las similitudes genéticas, morfológicas, reproductivas y productivas de los individuos con su padre recurrente eran mayores. Mediante marcadores moleculares se evidenció la existencia de apareamiento entre cromosomas de ambas especies y la incorporación de resistencia efectiva a enfermedades en los híbridos producidos (Carputo *et al.* 2002 y 2003, Barone *et al.* 1999, Iovene *et al.* 2004).

En Uruguay *S. commersonii* es una de las especies que se ha incorporado al Programa de mejoramiento de papa del INIA, con el objetivo de obtener cultivares resistentes a *R. solanacearum*. Para llevar a cabo los cruzamientos interespecíficos, se planteó un esquema de cruzamientos basado en la manipulación de la ploidía a través del uso de gametos no reducidos y uso de la especie puente *S. phureja* (phu; $2n = 2x = 24$, 2 NBE), seguido de las retrocruzas con tbr (González, 2010) (Fig 2). Este esquema ha tenido exitosos resultados en la producción de retrocruzas avanzadas.

Estudios citogenéticos y genéticos recientes en estos híbridos han puesto en evidenciando que hay apareamiento entre cromosomas de tbr y *S. commersonii* (Gaiero *et al.*, 2017). A medida que se avanza en las retrocruzas se mejora el comportamiento productivo y reproductivo de las progenies que, sin embargo, siguen conservando varias características morfológicas del padre silvestre (Fig 3). En dichas progenies se ha observado que hay una amplia segregación respecto a la resistencia a *R. solana-*

cearum (González 2010) y que no existiría interacción entre la cepa del patógeno y el genotipo utilizado de *S. commersonii* (Siri *et al.* 2011, González *et al.* 2013).

La falta de diferenciación entre los genomas del género *Solanum* sección Petota dentro del cual se incluyen *tbr* y *cmm* (Matsubayashi *et al.* 1991, Camadro *et al.* 2004) sumado a las observaciones del apareamiento entre cromosomas homeólogos y posterior segregación de los mismos durante la meiosis de híbridos triploides entre *cmm* y *tbr* y en individuos de las retrocruzadas 1 y 2 realizadas por Gaiero *et al.* (2017) sugieren un apareamiento no preferencial entre los cromosomas homeólogos y una segregación balanceada de los mismos durante la formación de los gametos.

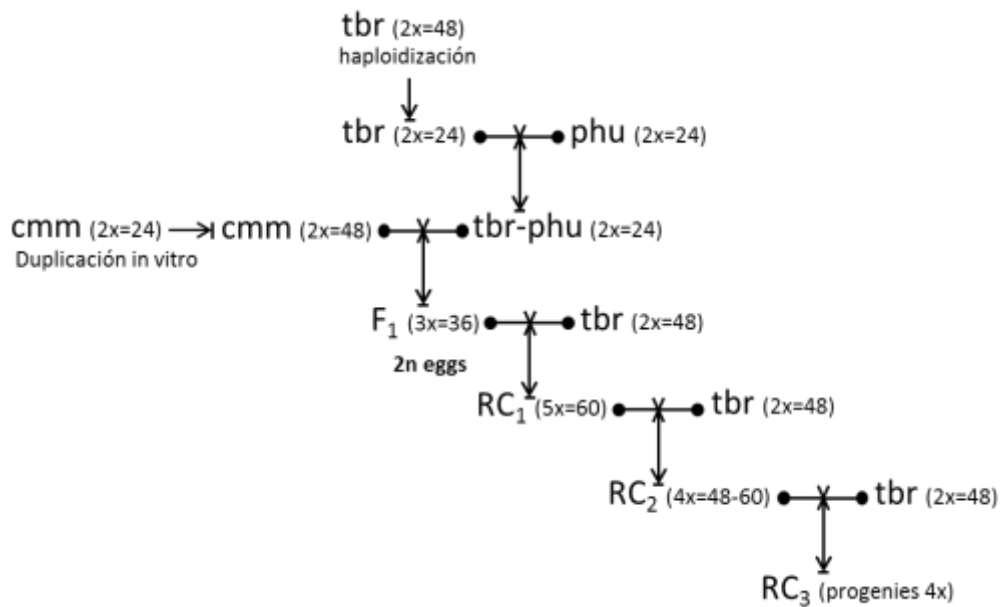


Figura 1. Esquema de mejoramiento por introgresión de *S. commersonii* en el pool génico de *S. tuberosum* subsp. *tuberosum* (Carputo *et al.*, 1997).

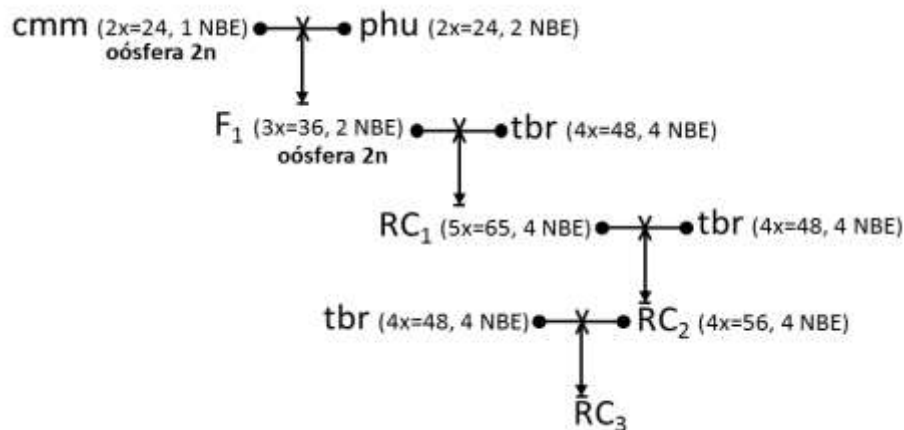


Figura 2. Esquema de mejoramiento por introgresión de *S. commersonii* en el germoplasma de *S. tuberosum* subsp. *tuberosum* generado en el Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA) Las Brujas (González, 2010).



Figura 3. Ejemplo de segregación de características morfológicas en una progenie de tercera retrocruza de introgresión de germoplasma de *S. commersonii* en papa según el esquema descrito en la Fig. 2. En la fila superior a la izquierda se muestran los tubérculos de la accesión original de *S. commersonii* (04023) y los progenitores de la familia: el individuo de la BC_2 (09509.6) y el cultivar de papa Atlantic. En la fila inferior se muestran tubérculos de distintos individuos de la RC_3 .

1.6 HIPÓTESIS PLANTEADAS

En base a los antecedentes presentados, las hipótesis planteadas para esta tesis son:

En una retrocruza 3:

- 1) Se recupera y mantiene la resistencia a *R. solanacearum* proveniente de *S. commersonii*.
- 2) Bajo el supuesto de apareamiento no preferencial de los cromosomas en los progenitores tbr ($2n = 48$) y RC₂ ($2n = 56$), el valor promedio más frecuente de ploidía que se espera es $2n = 52$.
- 3) La aneuploidía esperada afectará negativamente el crecimiento de los individuos y el rendimiento en tubérculos, debido un efecto fisiológico similar al estrés.
- 4) Morfológicamente una alta proporción de individuos serán similares al progenitor recurrente en esta generación.
- 5) La fertilidad de polen de los individuos de esta retrocruza será baja ya que se utilizaron progenitores con muy baja fertilidad de polen.

1.7 OBJETIVOS

En base a estas hipótesis, el objetivo general del trabajo es estudiar el grado de incorporación de características provenientes de *S. commersonii* en el genoma de la papa cultivada luego de tres retrocruzas con esta última como progenitor recurrente y su relación con la resistencia a *R. solanacearum* y características citogenéticas, morfológicas y agronómicas para evaluar el avance de este programa de cruzamientos y definir estrategias para la utilización del germoplasma de esta especie en el futuro.

Los objetivos específicos de este trabajo son:

En una progenie derivada de la tercer retrocruza del híbrido cmm x tbr con tbr como progenitor recurrente, realizar: (1) la evaluación de la resistencia a *R. solanacearum*

(2) la caracterización citogenética, y (3) la caracterización reproductiva, morfológica y agronómica, y su relación con el nivel de aneuploidía remanente, para evaluar la necesidad de continuar con el esquema de retrocruzas.

2. POTATO INTROGRESSIVE HYBRIDIZATION BREEDING FOR BACTERIAL WILT RESISTANCE USING SOLANUM COMMERSONII Dun. AS DONOR: GENETIC AND AGRONOMIC CHARACTERIZATION OF A BACKCROSS 3 PROGENY

Mariana Andino¹, Guillermo Galván¹, Francisco Vilaró², Paola Gaiero¹, Pablo Speranza¹.

¹Department of Plant Biology, Facultad de Agronomía, Universidad de la República. Garzón 780, PC 12900, Montevideo, Uruguay.

²Horticulture Unit, National Institute for Agricultural Research, Ruta 48 km 10, Las Brujas, Uruguay.

Corresponding Author: Pablo Speranza, pablosperanza@gmail.com

Telephone: (+598) 23553503

Fax: (+598 2) 3590436

Revista de publicación: Potato Research

2.1 ABSTRACT

Bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum* is one of the main diseases currently facing potato cultivation. *Solanum commersonii* Dun. (cmm; $2n = 2x = 24$, 1 ENB), is a native species from southern Brazil, Uruguay and Mesopotamia Argentina with desirable traits for introgressive hybridization into cultivated potato such as resistance to *R. solanacearum*. In Uruguay, successful crosses between cmm and *Solanum tuberosum* subsp. *tuberosum* (tbr; $2n = 4x = 48$, 4 EBN) have been carried out with this objective, resulting in successive backcross 1, 2 and 3 progenies. The aim of this study was to analyze the resistance to *R. solanacearum* of one backcross 3 progeny (BC₃), to characterize this progeny cytogenetically, reproductively, morphologically and agronomically, to evaluate the effect of the remaining aneuploidy on its

performance and to define a strategy for future breeding. Resistance to *R. solanacearum* showed a pattern of transgressive segregation. About 52% of individuals have ploidies near that of the cultivated potato ($2n = 48$). All BC₃ individuals showed male sterility, probably due to nuclear-cytoplasmic interactions. Although there was wide segregation in morphological characters, most individuals tended to resemble the recurrent tbr parent. A strong relationship between the number of extra chromosomes and the wild genome content in some BC₃ hybrids negatively affected their agronomic performance. More backcrosses may be necessary to incorporate desirable traits from cmm into tbr germplasm allowing for further recombination. Likewise, the presence of individuals with chromosome numbers close to $2n = 48$, combining morphological traits from tbr with good levels of resistance to *S. commersonii* a promising genetic resource for potato breeding.

Keywords: *Solanum commersonii*, *Ralstonia solanacearum*, resistance, chromosome number, agronomic performance, backcross 3.

Acknowledgements: Research was supported by: Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII) and Departamento de Biología Vegetal of Facultad de Agronomía - Universidad de la República (Udelar). We are thankful to Cristina Mazzela, Magdalena Vaio and the staff of Laboratorio de Evolución y Domesticación de Plantas of Facultad de Agronomía - Udelar for the permanent support, patience and valuable suggestions. We wish to thank Pablo Sandro, Matías Antuoni and Julio Esburlatti for their assistance during the development of the experiments. We are also grateful to Alicia Castillo, Victoria Bonecarrere and the technical staff at INIA and María Ines Siri, Maria Julia Pianzola and the staff at Laboratorio de Microbiología of Facultad de Química - Udelar for kindly providing plant material and for inoculation preparation. We also want to thank Elsa Camadro for her useful suggestions.

2.2 INTRODUCTION

Cultivated potato (*Solanum tuberosum* L) within which the economically most important form is the tetraploid *Solanum tuberosum* subsp. *tuberosum* (tbr; $2n = 4x = 48$, 4 EBN), is the third most important food crop in the world after wheat and rice and is considered critical in terms of global food security (Birch 2012). Currently the crop is threatened by bacterial wilt, the main economically important bacterial disease affecting production around the world (Fernández et al. 2015), which causes devastating losses and may even limit production in cold and temperate zones. In America bacterial wilt is mainly caused by *Ralstonia solanacearum* (Smith 1896; Yabuuchi et al. 1996), Phylotype II, sequevar 1 (Fegan and Prior 2005), historically known as Race 3, biovar 2 (Hayward 1991). It is estimated that worldwide, around 1.53 million hectares are affected annually and direct production losses range between 33% and 90% (Patil et al. 2012; Yuliar et al. 2015). Potato varieties cultivated in Uruguay are mostly susceptible and production losses can reach up to 34% in years climatically favorable for the development of the disease (González et al. 2013). Outbreaks are more and more frequent because popular cultivars are susceptible, because of the high persistence of the pathogen in the soil, and because climate change is expected to make favorable environmental conditions more likely.

Strategies for the cultural control of the disease have been the subject of research and have been carried out for decades without major results. Cultural practices are limited because the pathogen has a wide range of hosts, a wide geographic distribution, and a high capacity of survival in the soil. Chemical control is not feasible, because it may increase the cost of production, and is considered unfriendly to the environment and human health (Patil et al. 2012). There is an urgent need for cost-effective, environmentally-friendly control methods for this disease. One of the main tools for the control of *R. solanacearum* is in-built genetic resistance to the disease developed through breeding by using wild relatives as donors (Jansky 2006; Bradshaw et al. 2006, 2009; Patil et al. 2012). Although several sources of resistance have been used, results have not been positive due to the instability of the resistance and the low

commercial quality achieved in the development of resistant cultivars (Tung et al. 2006; Patil et al. 2012). Therefore, the search for new and more stable sources of resistance has been the aim of several breeding programs worldwide including those of CIP and EMBRAPA (González 2010).

Uruguay, along with southern Brazil, part of the Argentinian Mesopotamia and the province of Buenos Aires (Correll 1962) are the center of origin and diversity of *Solanum commersonii* Dun. (Hawkes 1994) (cmm; $2n = 2x = 24$, 1 EBN), a diploid wild potato relative which possesses several desirable traits. Besides resistance to several other biotic and abiotic stresses, *S. commersonii* holds resistance to *R. solanacearum* Phylotype II, sequevar 1 (Chen et al. 1999; Laferriere et al. 1999; Micheletto et al. 2000). Diversity studies carried out on native germplasm in Uruguay have found that there are different degrees of resistance among accessions (Galván et al. 2006; Siri et al. 2009; González et al. 2013).

One of the strategies to incorporate resistance against *R. solanacearum* into the cultivated potato genome is introgression (Carputo et al. 1997; Jansky 2006). It is possible to overcome post-zygotic hybridization barriers due to differences in the Endosperm Balance Number (EBN) between tbr (4 EBN) and cmm (1 EBN), which causes embryo death because of the non-functionality of the endosperm (Johnston et al. 1980). Different strategies have been used to overcome this barrier, such as the manipulation of ploidy levels (Cardi et al. 1993; Carputo 1995, 1997; Jansky 2006) and the use of the unreduced gametes naturally produced by cmm (Stelly and Peloquin 1986; Peloquin et al. 1999; Carputo et al. 2000; Jansky 2006; Bradshaw and Bonierbale 2010). These strategies indicate that it is possible to incorporate resistance to *R. solanacearum* from *S. commersonii* to potato cultivars. Successful crosses, using unreduced gametes in the early stages of the introgressive hybridization scheme have been carried in Uruguay (González 2010; Gaiero et al. 2017). Until the second backcross progeny, resistance has been shown to behave as a polygenic character, and a wide and transgressive segregation has been observed for this characteristic within full-sib progenies (González et al. 2013). However, it is not known whether this resistance can be retained in more advanced backcrosses of this program. Cytogenetic

and molecular marker studies in the progenies of the introgressive hybridization program have confirmed a tendency to reach euploidy ($2n = 4x = 48$) and a reduction in the genetic contribution of *S. commersonii* (Barone et al. 2001; Carputo et al. 2002, 2003; Iovene et al. 2004; Giambiasi 2011). The lack of strong evidence on genomic and chromosomal differentiation between species of the genus *Solanum* section *Petota* (Matsubayashi 1991; Camadro et al. 2004) added to observations of homeologous chromosome pairing, chromatin recombination and regular chromosome segregation during meiosis of triploid hybrids cmm and tbr and in individuals of the backcrosses 1 and 2 performed by Gaiero et al (2017) suggest a non-preferential homeologues pairing and balanced chromosome segregation in meiosis and gene introgression.

There is evidence that there is pairing between the chromosomes of tbr and cmm in hybrids and further backcrosses (Barone et al. 1999, 2001; Gaiero et al. 2017). Because many crossing schemes begin with sexual or somatic polyploidization steps, higher chromosome numbers in the progenies imply a higher content of wild germplasm (Ono et al. 2016), and consequently it is expected that the higher the chromosome number, the more the backcross progeny plants will perform like the wild parent.

One of the objectives of introgressive hybridization programs is to recover the morphology and agronomic performance of the recurrent parental species, and to verify the presence of the desirable characters of the donor parent. In the introgression schemes between potato and cmm, it has been observed that even though successive backcrosses improve productive and reproductive behavior some individuals still retain many morphological characteristics of the wild parent (Carputo et al. 2002; Barone et al. 2001).

In this context, this research aimed to analyze the resistance to *R. solanacearum* of one backcross 3 progeny (BC_3), to characterize those BC_3 hybrids cytogenetically and to evaluate the effect of the ploidy on resistance and agronomic performance, to evaluate the hybrids pollen fertility considering the low fertility of the parents and to

characterize them, morphologically and agronomically to define a strategy for further backcrossing

2.3 MATERIALS AND METHODS

2.3.1 Plant material

Sixty-five BC₃ interspecific hybrids obtained through the crossing scheme described (**Fig.1**) were used. They were produced by a directed cross between tbr (cv. Atlantic, 2n = 48) x BC₂ (09509.6, 2n = 56). The seeds obtained from this cross were germinated in vitro in Petri dishes with MS medium (Murashige and Skooge 1962) after immersion in a solution of 1500 ppm gibberellic acid overnight to break down seed dormancy. Once the seedlings germinated, they were multiplied in vitro in order to obtain sufficient plant material for the field trial, bacterial wilt resistance assays and an in vivo collection for extraction of roots and leaves for cytological analyses.

2.3.2 Resistance assays

For the analysis of resistance to bacterial wilt, the 65 BC₃ individuals were evaluated along with their parental genotypes. The experiment was arranged in a randomized complete block design with eight replicates of each individual as an experimental plot. The criterion used to block was the proximity of experimental plots which could cause inequality of development in plants. Plantlets were micropropagated in vitro and transferred and acclimated in multicell trays filled with horticultural substrate at 18 cm³ per plant. The soil of each plant (at the stage of 7-8 leaves) was inoculated with 1 mL of serum containing 1×10^8 cfu mL⁻¹ of the strain of *R. solanacearum* **UY036** of Phylotype II, sequevar 1, isolated in Uruguay. Prior to inoculation, wounds were generated in the roots, according to a technique based on Montanelli et al. (1995) and adjusted by González et al. (2013). Plants were kept under controlled environmental conditions (12:12 hours of light: darkness, 27-28 °C, constant soil moisture). The evaluation of the percentage of wilted plants in each genotype was performed 28 days after inoculation (dai). The following categorization based on the percentage of wilted plants was used to establish the levels of resistance or suscepti-

bility of each genotype: R = resistant (0 - 25 %), MR = moderately resistant (26 - 50 %). MS = moderately susceptible (51 - 75 %) and S = susceptible (76 – 100%).

2.3.3 Chromosome counts

To perform chromosome counts for each genotype of the BC₃ progeny, root tips were collected and were pre-treated with 2 mM (w/v) aqueous 8 – hydroxyquinoline for 4 hours at 20 ° C and 20 hours at 4 °C. These were then fixed in Carnoy solution (v/v, 3:1 ethanol: acetic acid) for 48 hours, transferred to 70 % ethanol and kept at 4° C until use. The root tips were treated with an enzyme mix containing 2 % pectinase (from *Aspergillus niger*, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA, P-4716) and 3 % cellulase RS (Yakult 203033, Yakult Pharmaceutical, Tokyo, Japan) in 10 mM citrate buffer (pH 4.5) for 2 to 4 h at 37° C and macerated in 60 % acetic acid. Slides were frozen with liquid nitrogen to remove the coverslips and then stained with 1% acetic carmine solution. At least 10 mitotic metaphase cells complements were observed counted per genotype. Cells were photographed on an Olympus CX41 Photomicroscope with an Infinity 1 camera. Chromosomes were counted with the aid of the software Image J version 1.48.

2.3.4 Field trials for morphological and agronomic traits

For the morphological, physiological and agronomic evaluation of the BC₃ genotypes, we used a field trial including the parental genotypes. Plants were transplanted to the experimental plots on November 29, 2012 and the last plants harvested on May 14, 2013. We evaluated 21 quantitative and 12 qualitative variables related to cytological, morphological, physiological and agronomic traits, selected considering prior reports of heritability and repeatability Huamán (2008) and Da Silva et al. (2009) (**Table 1 in annex 1**). The study was arranged in a randomized complete block design with two replicates and five plants of each genotype as an experimental plot.

2.3.5 Pollen stainability

Flower buds from 39 BC₃ and five parental genotypes were collected near anthesis from plants in the field trial. They were fixed in Carnoy solution and stored at 4 °C until used for microscopic observations. The pollen grains extracted from anthers were stained with 1% acetic carmine. The preparations were photographed in an Olympus CX 41 Photomicroscope using an Infinity camera at 20 X magnification. We counted 200 pollen grains for each genotype from the photographs taken, classifying them into stainable and non-stainable pollen. In non-stainable pollen, the kinds of abnormalities observed were recorded.

2.3.6 Data analysis

The averages of quantitative variables for each BC₃ individual were subjected to Principal Components Analysis (PCA) with the statistical software InfoStat (Di Rienzo et al. 2015), to observe the most discriminating variables between cmm y tbr. Averages of quantitative variables and modes of qualitative variables were analyzed together through Principal Coordinates (PCoA) using the Gower Coefficient (Gower J 1971) with the statistical software RStudio version 2.15.3 (2015). For the quantitative and qualitative variables, the correlation matrix between variables was calculated using InfoStat (Di Rienzo et al. 2015).

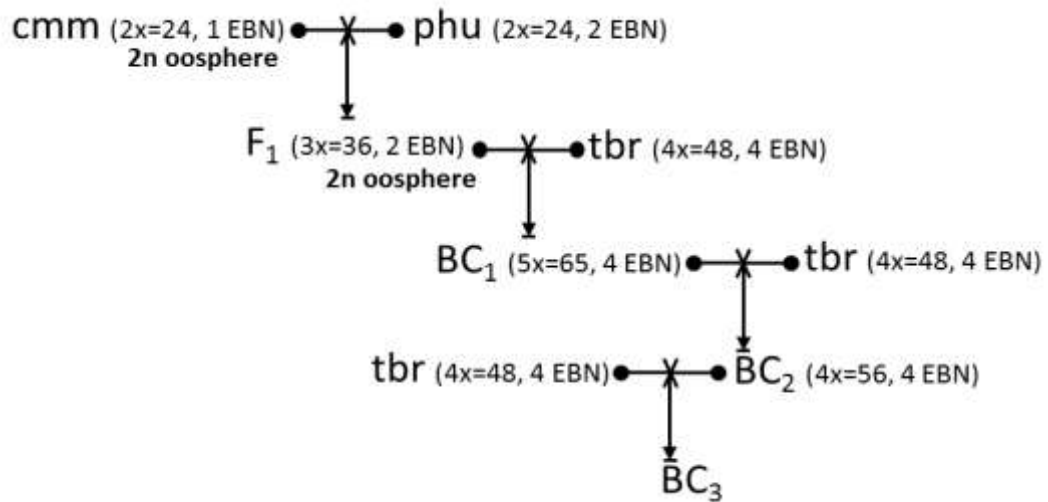


Figure 1 Breeding scheme for the introgression of *S. commersonii* (cmm) into *S. tuberosum* subsp. *tuberosum* (tbr) generated in the National Institute of Agricultural Research (INIA. Las Brujas) (González, 2010). The Uruguayan clone of *S. commersonii* used (04023) presents moderate susceptibility to *R. solanacearum* Phylotype II secuevar 1. The *S. phureja* (phu) clone 195 was used as bridge species, and tbr clones CIP 382284.16, 8809 and commercial cultivar Atlantic were used as subsequent recurrent parents. All materials belong to INIA germplasm collection.

2.4 RESULTS

2.4.1 Resistance to *R. solanacearum*

We have observed a great range of segregation in the resistance to *R. solanacearum* in the BC₃ progeny, with individuals displaying responses from moderately resistant to susceptible (**Fig. 2**). Although 50% of genotypes were susceptible like the recurrent parent tbr, some plants showed resistance levels even higher than their masculine parent BC₂ and of the donor genotype of *S. commersonii*.

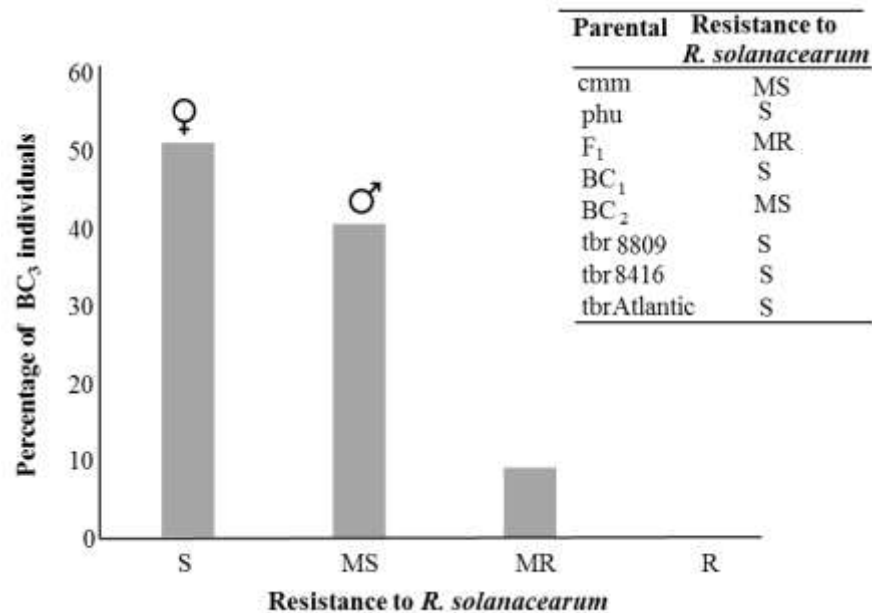


Figure 2 Percentage of BC₃ individuals according to the response to *R. solanacearum* strain UY036, evaluated as the average proportion of wilted plants per plot 28 days after inoculation. R = resistant (0 – 25 %), MR = moderately resistant (26 – 50 %). MS = moderately susceptible (51 – 75 %) and S = susceptible (76 – 100 %). In the upper right corner parents response is described: *S. commersonii* (cmm), *S. phureja* (phu), triploid hybrid F₁ (F₁), pentaploid hybrid BC₁ (BC₁), parental hybrid (BC₂) and *S. tuberosum* subsp. *tuberosum* (tbr). On top of bars the position of the masculine (BC₂) and female (tbr cv. Atrantic) parents is indicated.

2.4.2 Chromosome segregation

We found a wide range of segregation in chromosome numbers in the BC₃ progeny (**Fig. 3**). All chromosome numbers ranging from $2n = 46$ to $2n = 54$ were found in the progeny. The most frequent chromosome number observed was $2n = 49$ which represents 35 % of the BC₃ hybrids, and the second most frequent number was $2n = 48$, (14 %) but only 12 % of the BC₃ individuals displayed the midparent value of $2n = 52$. Although 80 % of this progeny have extra chromosomes, 52 % of BC₃ hybrids show chromosome numbers close to that of tbr, with $2n = 47$ to 49 (**Fig.3**).

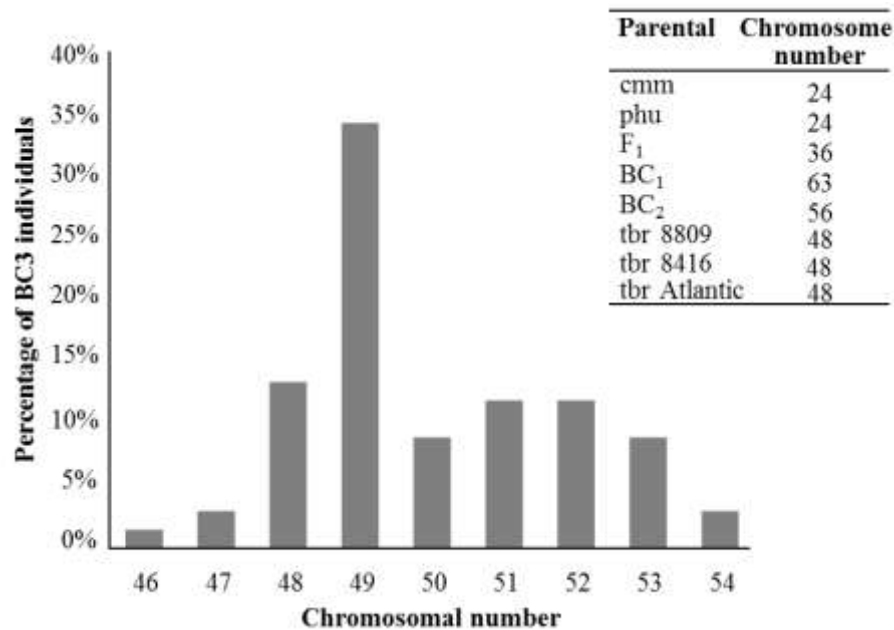


Figure 3 Distribution of BC₃ individuals according to the number of chromosomes observed in the 10-cell mitotic metaphase of the meristem root. In the upper right quadrant, we describe the chromosomal number of the parents *S. commersonii* (cmm), *S. phureja* (phu), triploid hybrid F₁ (F₁), pentaploid hybrid BC₁ (BC₁), parental hybrid (BC₂) and *S. tuberosum* subsp. *tuberosum* (tbr).

2.4.3 Morphological, agronomical and reproductive characterization

A wide segregation of morphological and physiological traits was observed in this progeny but no morphological or physiological aberrations were found. Principal coordinate (PCoA) and Principal Component (PCA) analyses showed that there is a trend in the morphological distribution of these genotypes towards the recurrent parent (**Fig. 4** and **Fig. 5**). On the other hand, the two first components of the PCA, which explain 40.5 % of the variation, indicate that morphological features like less rotated flower shape and leaves with a higher length/width ratio of the terminal leaflet may be associated with a higher number of low-weight tubers per plant, characteristic of *S. commersonii*. Vigorous higher plants with larger leaves, longer lateral leaflets, and bigger more rotated flowers, tended to produce a smaller number of heavier tubers approaching tbr forms (**Fig.5**).

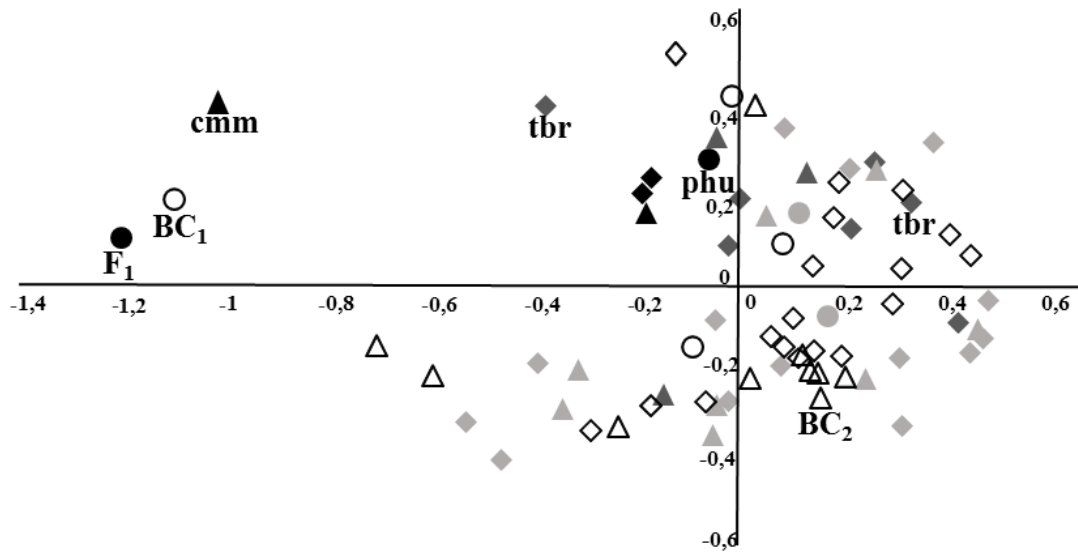


Figure 4 Cytogenetic, morphological and agronomic variability of the BC₃ and its parental genotypes using quantitative and qualitative variables in a Principal coordinate analysis (PCoA). Characterization of BC₃ individuals by level of resistance to *R. solanacearum* (circle: moderately resistant; triangle: moderately susceptible; diamond: susceptible) and chromosome number (black <48, dark gray 48, light gray: 49, white > 49). Parental individuals: cmm: *S. commersonii*, phu: *S. phureja*, tbr: *S. tuberosum* subsp. *tuberosum*; F₁: 3x hybrid, BC₁: 5x hybrid; BC₂: parental hybrid.

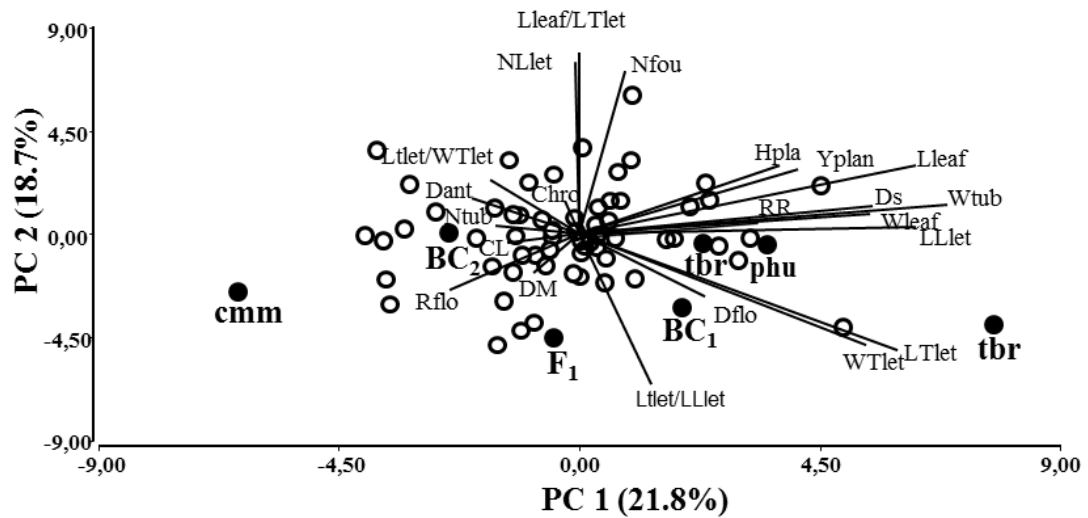


Figure 5 Cytogenetic, morphological and agronomic variability of the BC₃ and its parental genotypes using quantitative and qualitative variables in a Principal Components analysis (PCA): Chro: Chromosome number, Hpla: plant height (cm), Wleaf: leaf width (mm), Lleaf: leaf Length (mm), LTlet: terminal leaflet length (mm), Lleaf/LTlet: ratio of leaf length to terminal leaflet length (mm), NLlet: number of Lateral leaflets, WTlet: terminal leaflet width (mm), LLlet: lateral leaflet length (mm), LTlet/WTlet: ratio of terminal leaflet length to terminal leaflet width (mm), LTlet /LLlet: ratio of terminal leaflet length to lateral leaflet length, Nfou: number of foliulos, Ds: stem diameter (mm), Ntub: number of Tubers per plant, Wtub: Tuber weight (g), Yplan: Yield per plant (gr), DM: dry matter (%), Dflo: Flower diameter (cm), Rflo: Flower shape, Dant: Days to anthesis (days), CL: Cycle length (days), RR: resistance to *R.solanacerum* (% wilted plants). Gray circles BC₃ progeny, Black circles parental individuals: cmm: *S. commersonii*, Phu: *S. phureja*, tbr: *S. tuberosum* subsp. *tuberosum*, F₁: 3x hybrid, BC₁: 5x hybrid, BC₂ parental hybrid.

All the BC₃ individuals evaluated had yielded significantly less tuber weight (kg plant⁻¹) than tbr cv Atlantic. No BC₃ progeny produced significantly fewer tubers (Ntub) than Atlantic but tuber weight (Wtub) was lower than that of the commercial parent. Only 12% of the individuals yielded significantly more than *S. commersonii*.

Significant differences were also found for cycle length (CL) among BC₃ individuals. While all the genotypes showed shorter cycles than *S. commersonii* (data not shown), 42 out of 65 BC₃ genotypes had a longer cycle than tbr. This variable presented a positive correlation with yield (Yplan). No differences were found for dry matter content (DM) in this experiment, neither among the parents nor in the progeny (Table1).

Table 1 Pearson correlation coefficients (r) below the diagonal, and their associated probability (above the diagonal) between chromosome number (Chro) of the BC₃ progeny and performance components. CL: Cycle length (days from transplanting to 50% of foliage senescence). Ntub: tubers harvested per plant, Wtub: weight per tuber (g tuber⁻¹), Yplan: yield per plant (g plant⁻¹), DM: dry matter of tubers (%) and RR: resistance to *R. solanacearum* (disease incidence at 28 dpi).

	Chro	CL	Ntub	Wtub	Yplan	DM	RR
Chro	-	0.36	0.05	0.26	0.05	0.45	0.89
CL	0.12	-	0.08	0.00	0.00	0.15	0.11
Ntub	-0.24**	0.22*	-	0.37	0.00	0.99	0.41
Wtub	-0.14	0.47****	-0.11	-	0.00	0.97	0.12
Yplan	-0.24*	0.57****	0.54****	0.70****	-	0.98	0.35
DM	-0.10	0.18	0.00	0.00	0.00	-	0.19
RR	-0.02	0.20	0.10	0.20	0.12	0.17	-

Correlation coefficient significant with (*) $P \leq 0.10$; (**) $P \leq 0.05$; and (***) $P \leq 0.01$.

The vast majority of the individuals of this cross were male sterile, only one individual had moderate levels of pollen fertility (Table 2). Microscopic observation revealed several morphological problems in the pollen grains such as empty grains, granular cytoplasm and defects in the formation of intine and exine

Table 2 Evaluation of male fertility of the BC₃ individuals and their parents determined by microscopic observation of 200 pollen grains previously stained with 1% aceto carmine.

Individual	Pollen fertility percentage (%)	Malesterility
BC ₃ clon 7	3.1	Yes
BC ₃ clon 27	2.1	Yes
BC ₃ clon 38	1.2	Yes
BC ₃ clon 51	6.7	Yes
BC ₃ clon 70	30.4	No
BC ₃ clon 72	5.5	Yes
Rest of BC ₃ clones	0.0	Yes
<i>S. commersonii</i>	85.0	No
<i>S. phureja</i> *	95.0	No
F ₁	12.0	No
BC ₁ *	39.0	No
BC ₂	38.0	No
<i>S. tuberosum</i> subsp. <i>tuberosum</i> clon 8816*	82.0	No
<i>S. tuberosum</i> subsp. <i>tuberosum</i> cv. Atlantic	19.4	No

* Data from González (2010)

2.4.4 Chromosome number and other characters

The correlation analysis provided evidence of a negative significant relation between chromosome numbers (Chro) and yield per plant (Yplan). On the other hand, ANOVA showed no statistically significant differences among individuals with 49 or fewer chromosomes and the rest of the individuals for Yplan or Ntub (data not shown). No correlation was found between Chro and CL as well as between Chro and DM content (**Table 1**).

No statistically significant correlation between chromosome number and disease resistance was found (**Table 1**). Nevertheless, most of the BC₃ genotypes which exhibited some level of resistance (MR and MS) resembled the hybrid parent (cmm x tbr) BC₂ morphologically and physiologically, and had in turn, mostly high chromosome

numbers (≥ 49). The majority of the individuals with 46 to 48 chromosomes clustered morphologically close to the potato parents and are mostly susceptible (S). In spite of the association between the number of chromosomes and performance, remarkably, a few individuals which are morphologically close to the tbr parent showed good levels of resistance (MR) to *R. solanacearum* (**Fig. 4**).

2.5 DISCUSSION

2.5.1 Resistance to *R. solanacearum*

We observed considerable segregation for the level of resistance to *R. solanacearum* among individuals extending beyond that of the more resistant parent in a transgressive segregation pattern. This behavior is similar to that found by González (2010) in the F₁, BC₁ and BC₂ generations of the same crossing scheme and in other similar (BC₁) tbr x cmm crosses (Carputo et al. 2009) and tbr x *S. chacoense* (Watanabe et al. 1992) for the same bacterial disease. It is remarkable in these cases, that in the BC₃ generation it is possible to obtain genotypes of equal or greater level of resistance than that of the donor parent, even when starting from an individual of *S. commersonii* of intermediate resistance to the disease.

This type of segregation points at a polygenic mode of inheritance for this trait (Watanabe et al. 1992). Many authors support the hypothesis that resistance to *R. solanacearum* from wild *Solanum* may not be conferred by a single locus (Tung 1992; Gao et al. 2000; Chen et al. 2013; Yanping et al. 2014). Tung et al. (2006) suggested that resistance from wild *Solanum* donors is polygenic with more than one major effect gene. According to the findings of Narancio et al. (2013) and Baichoo and Jaufeerally-Fakim (2017), these genes could be involved in the regulation of salicylic acid and ethylene synthesis, both compounds associated with plant defense against biotrophic and necrotrophic pathogens respectively. This type of inheritance, although complex, is more desirable because it usually leads to resistance that is more durable by exerting less selective pressure on the pathogen towards more virulent strains (Micheletto et al. 2000).

2.5.2 Chromosome number

A higher frequency of genotypes with 52 chromosomes was expected based on the chromosome number of the chosen parents BC₂ ($2n = 56$) and tbr cv. Atlantic ($2n = 48$) and the assumption of non-preferential pairing of the chromosomes. Contrary to this, we observed that the most frequent chromosome number was 49, that is, three chromosomes fewer than expected. Although there is still a wide segregation in chromosome number in this generation, 52% of these hybrids had between 47 and 49 chromosomes, showing a clear tendency to approach the chromosome number of the recurrent parent ($2n = 48$). Although highly probable, without further analysis, we cannot assess whether the individuals with $2n = 48$ recovered are fully euploid; i.e. they possess four complete monoploid sets.

Chromosome numbers which are lower than expected have been reported in the first backcross progenies between tbr x cmm crosses by Carputo et al. (1997, 2003); Barone et al. (2001) and Iovene et al. (2004). This suggests the action of some mechanism favouring individuals with chromosome complements close to that of tbr used as recurrent parent in the early stages of the backcrossing scheme. Under the assumption of normal segregation of chromosomes in the tbr gametes ($2x = 48$), the BC₂ gametes with the greatest success in this crossing had between 23 and 25 chromosomes, similar to the tbr gametes. This could be indicating that the selection mechanism acts at the level of the EBN and those gametes produced by the BC₂ parent with an EBN close to that of the EBN of the tbr gametes of the recurrent parent, allowed the 2:1 ratio to be fulfilled and thus to predominate in number of successful seeds. This result coincides with that reported by Carputo (1999) for $3x$ (cmm x tbr) x $2x$ (tbr) crosses. Another hypothesis proposed in several works involving hybrids between tbr x cmm and tbr x *S. phureja* suggest that chromosome numbers very close to that contributed by tbr, can be attributed to the preferential elimination of the chromosomes from one of the parents at those stages, and that this mechanism would be under genetic control (Pijnacker et al. 1987; Carputo et al. 2003; Clolow et al. 1991). Preferential elimination could be due to lack of affinity between certain chromosomes and spindle microtubules as observed by Laurie and Bennett (1988) in in-

terspecific hybrids of cereals. On the other hand, Henry et al. (2009), working with different cytogenetic and molecular techniques in *A. thaliana* triploids, observed selection in favor of balanced gametes, but also the existence of selection at the karyotype level of different chromosomes which, if present even in unbalanced gametes, give rise to viable individuals. This hypothesis could explain those gametes of higher ploidies from the BC₂ that also were successful in our crosses.

2.5.3 Segregation for morphologic and agronomic characters

A wide segregation of morphological and physiological characters was evidenced in this progeny but no clear grouping of the individuals was evident (**Fig 4**). Although most of individuals tended to deviate markedly from *S. commersonii* and resembled their parents (tbr and BC₂), some characteristics of *S. commersonii* are still strongly evident in this generation, such as cycle length. This type of wide morphological segregation we also observed, to a greater or lesser extent, in other BC₃ progenies from similar backcrossing schemes. Nonetheless, in agreement with the results of Barone et al. (2001) and Carputo et al. (2002) in BC₃ generations of tbr x cmm, most individuals morphologically resembled the BC₂ and the recurrent tbr parents.

Some morphological and physiological characteristics seem to be associated with one or the other parent. For example, late flowering, less rotated flower shape, greater length /width ratio of the terminal leaflet, longer cycles and higher number of tubers per plant are characteristic of *S. commersonii*. Vigorous plants with rotated flowers and shorter cycles tend to show higher tuber weight, characteristic of tbr (fig 5). Given the high repeatability of these variables (Huamán 2008; da Silva et al. 2009), this association makes them putative morphological markers to predict potential yield or agronomic behavior at the early stages of development.

2.5.4 Agronomic performance

All the BC₃ individuals yielded less than the commercial potato cultivar Atlantic used as the female parent, and only 12% of the progeny yielded significantly more than the wild donor *S. commersonii*. This lower yield was mainly related to a lower

tuber weight. The main factor associated with the lower tuber weight and therefore the yield per plant was likely the cycle length (Table 1). The results show that individuals with higher morphological and physiological similarity to the tbr parent have shorter cycles and larger tuber size (Fig 5). Then one possible physiological explanation of the low agronomic performance of these hybrids would be the incidence of the remaining wild germplasm. When evaluated in the context of the productive cycle of tbr, most BC₃ individuals with longer cycles could not express their agronomic potential, possibly because they could not complete the tuberization process. Another possible contribution of *S. commersonii* was tuber dry matter content (DM). We found no significant difference among the BC₃ hybrids, neither between these hybrids and tbr cv. Atlantic, nor the *S. commersonii* clone used. Therefore, it is difficult to conclude about the potential value of the effect of *S. commersonii* germplasm on DM, a very desirable character in potato cultivars, especially for processing.

2.5.5 Pollen fertility

Low pollen fertility was expected in these individuals because both male and female parents had low pollen viability, which could also be due to meiotic irregularities caused by the cytogenetic constitution of each individual or to the interaction of the tbr cytoplasm with some remaining *S. commersonii* genetic factors. In previous generations in this scheme, the cytoplasm was derived from the cmm donor, whereas in this generation it was swapped to tbr (**Fig 1**). Observations made on pollen grains of these hybrids show granular cytoplasm, exine and intine malformations and an abundance of empty grains, in agreement, with what was described by Edwardson (1970) in solanaceous species and Chase (2006) in other species with cytoplasmic male sterility. Male sterility, which is common in *Solanum*, has frequently been cited for crosses both within tbr and in interspecific crosses between *S. tuberosum* and wild species, including *S. commersonii* by Hammenan and Peloquin (1981), Vilaró et al. (1989), Iwanaga et al. (1991) and Camadro et al. (2004).

Meiotic segregation in the pollen parent showed irregularities as expected for an aneuploid individual but it was in general more regular than in previous generations

where subsequent improvements in fertility were observed (Gaiero et al. 2017). Upon further backcrossing, the negative effect of aneuploidy on male fertility is expected to decrease; however, pollen viability in this BC₃ progeny is lower than that of either parent in most individuals. It is likely then that the low fertility of most individuals is caused by a cytoplasmic effect of the particular clone used as a female parent and that their use as female progenitors for further backcrossing should not be compromised.

2.5.6 Chromosome number and performance

Unlike those individuals with 49 or more chromosomes, which appear scattered but with a tendency to associate with their BC₂ parent (Fig. 4), the majority of the individuals with chromosome numbers equal to or lower than 48 chromosomes clustered close to the parental tbr and tended to behave agronomically as potato. Higher chromosome numbers tend to be associated with lower yield per plant, mainly because fewer tubers per plant (Ntub) are produced. However, we did not find significant differences in yield per plant and tubers per plant between individuals with potato-like ploidies (49 or fewer chromosomes) and those with more than 49 chromosomes.

Aneuploidy *per se* may negatively affect physiological performance (Sheltzer et al. 2012) which may lead to lower yields; however, because these plants are polyploid, they are expected to be more tolerant to aneuploidy (Khush 1973). No morphological anomalies or decreases in vigor were observed in these plants and all of them were able to produce tubers to a greater or lesser extent, even if morphologically they resembled cmm. As reported by Ono et al. (2016) for a BC₁ progeny between (*S. demissum* x tbr) x tbr, in this program the number of chromosomes could be considered an estimate of the wild genome content. In our case, poor agronomic performance of the progeny is more likely due to the remaining wild germplasm than to aneuploidy. Similarly, no significant correlation was found between resistance to *R. solanacearum* and chromosome number, although a high proportion of the individuals which are morphologically and physiologically close to the recurrent parent had low chro-

mosome numbers and present higher levels of susceptibility to *R. solanacearum* as opposed to those individuals close to the BC₂ parent (**Fig. 4**).

In spite of the above, the presence of individuals with 48 and 49 chromosomes which are morphologically, physiologically and agronomically similar to tbr, and show levels of resistance to *R. solanacearum* similar to or higher than those observed in the donor parent clearly indicate that introgression of the relevant genes can be achieved. Observations of homoeologous pairing and multivalent configurations during the male meiosis of F₁, BC₁ and BC₂ from this backcrossing scheme indicate that recombination and therefore introgression is possible (Gaiero et al. 2017).

2.6 CONCLUSIONS

Is further backcrossing necessary?

Despite the presence of promising clones in terms of disease resistance and tuber size, our results indicate that there is a strong relationship between the number of extra chromosomes and the wild genome content in these hybrids, which negatively affected their agronomic performance. Longer cycles probably are the explanation for the low adaptation they showed to the climatic conditions in which we grew them and interfered with the expression of their yield potential. One or more additional backcrosses may be necessary to incorporate desirable traits from *S. commersonii* into *S. tuberosum* subsp. *tuberosum* germplasm allowing for more recombination. The behavior of these hybrids should be considered in the experimental design in order to evaluate the contribution of this wild species in breeding and to select genotypes according to agronomic characteristics such as yield and tuber size.

In addition, other characteristics of commercial interest such as skin and flesh color as well as glycoalkaloid content should be considered in future evaluations. A study with molecular markers is underway to elucidate some aspects of the interaction between these two genomes, such as the chromosome elimination mechanism, *R. solanacearum* resistance, and linkage relationships among favorable and unfavorable traits. Understanding these mechanisms together with the simplicity of the cross-

breeding scheme used, will probably facilitate the use of *S. commersonii* in breeding for resistance and adaptation in potato, and make its use more widespread and efficient.

2.7 REFERENCES

- Baichoo Z, Jaufeerally- Fkim Y (2017) *Ralstonia solanacearum* upregulates marker genes of salicylic acid and ethylene signaling pathways but not those of the jasmonic acid pathway in leaflets of *Solanum* lines during early stage of infection. Eur J of Plant Pathol 147: 615-625. doi:10.1007/s10658-016-1030-7
- 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. doi: 10.1139/g98-128
- Barone A, Sebastiano, A, Carputo D, Della Rocca F, Frusciante L (2001) Molecular marker-assisted introgression of the wild *Solanum commersonii* genome into the cultivated *S. tuberosum* gene pool. Theor App Genet 102: 902-907. doi: 10.1007/s001220000498
- Birch P, Bryan G, Fenton B, Gilory E. 2012 (2012) Crops that feed the world: 8: Potato are the trends of increased global production sustainable? Food Sec. 4 (4): 477-508. doi:10.1007/s12571-012-0220-1
- Bradshaw, J. E (2009) A genetic perspective, on yield plateau in potato. The Indian Potato Association 36(3-4): 79-94
- Bradshaw J, Bryan G, Ramsay (2006) Genetic resources (including wild and cultivated *Solanum* species) and progress in their utilization in potato breeding. Potato Res 49: 49-65. doi:10.1007/s11540-006-9002-5
- Bradshaw J, Bonierbale M (2010) Potatoes. In: Bradshaw J (ed) Root and tuber crops. Handbook of Plant Breeding. Springer – Verlag New York, pp 1-52. doi: 10.1007/978-0-387-92765-7
- Camadro E, Carputo D, Peloquin S (2004) Substitutes for genome differentiation in tuber- bearing *Solanum*: interespecific pollen-pistil incompatibility, nuclear-

cytoplasmic male sterility, and endosperm. *Theor Appl Genet* 109: 1369-1376. doi:10.1111/j.1438-8677.2012.00563.x

Cardi T, Iannamico V, D'Ambrosio F, Filippone E, Lurquin P (1993) In vitro regeneration and cytological characterization of shoots from leaf explants of three accessions of *S. commersonii*. *Plant Cell Tissue and Organ Cult* 34 (1):107–114. doi:10.1007/BF00048470

Carputo D (1999) Post-zigotic gametic selection due to endosperm balance number explains unusual chromosome number of 3x x 2x progeny in *Solanum*. *Sex Plant Reprod* 12: 27-31. doi:10.1007/s004970050168

Carputo D, Aversano R, Barone A, Matteo A, Iorizzo M, Sigillo L, Zoina A, Frusciante L (2009) Resistance to *Ralstonia solanacearum* of Sexual Hybrids Between *Solanum commersonii* and *S. tuberosum*. *Am J Potato Res* 86:196–202. doi:10.1007/s12230-009-9072-4

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 isolated relative (*Solanum commersonii* Dun.). *Proc Natl Acad Sci USA* 94 (22):12013–7. PMCID: PMC23688

Carputo D, Barone A, Frusciante L (2000) 2n gametes in the potato: essential ingredients for breeding and germplasm transfer. *Theor Appl Genet* 101:805–813. doi:10.1007/s001220051547

Carputo D, Frusciante L, Monti L, Parisi M, Barone A (2002) Tuber quality and soft rot resistance of hybrids between *Solanum tuberosum* and the incongruent wild relative *S. commersonii*. *Am J Potato Res* 79: 345-352. doi:10.1007/BF02870172

Carputo D, Parisi M, Consiglio F, Iovene M, Caruso G, Monti L, Frusciante L (2003) Aneuploid hybrids from 5x – 4x crosses in potato: Chromosome number, fertility, morphology and yield. *Am J Potato Res* 80:93–101. doi:10.1007/BF02870208

Clulow S, Wilkinson M, Waugh R, Baird E, De Maine M, Powell W (1991) Cytological and molecular observations on *Solanum phureja* –induced dihaploid potatoes. Theor Appl Genet 82: 545-551. doi:10.1007/BF00226789

Correll D (1962) The potato and its wild relatives. Texas Research foundation. Renner, Texas.

Chase C (2006) Cytoplasmic male sterility: a window to the world of plant mitochondrial-nuclear interactions. Trends in Genet 23: 81-89. doi: 10.1016/j.tig.2006.12.004

Chen L, Guo X, Xie C, He L, Cai X, Tian L, Song B, Liu J (2013) Nuclear and cytoplasmic genome componets of *Solanum tuberosum* + *S. chacoense* somatic hybrids and three SSR alleles related to bacterial wilt resistance. Theor Appl Genet 126: 1861-1872. doi: 10.1007/s00122-013-2098-5

Chen Y-KH, Palta JP, Bamberg JB (1999) Freezing tolerance and tuber production in selfed and backcross progenies derived from somatic hybrids between *Solanum tuberosum* L. and *S. commersonii* Dun. TAG Theor Appl Genet 99:100–107. doi:10.1007/s001220051213

Da Silva G, Pereira A, Castro C, Souza V, Carvalho F (2009) Repetibilidade e importancia de caracteres para avalidacao de colecao ativa de germoplasma de batata. Hortic. Bras 27(3): 290-293

Di Rienzo J, Casanoves F, Balzarini M, González L, Tablada M, Robledo C. InfoStat versión (2015). Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. <http://www.infostat.com.ar> . Consulted 17/06/2016.

Edwardson J (1970) Cytoplasmic male sterility In: Cronquist A. (ed). The Botanical Review. NY Botanical Garden, pp 341- 406.

Fegan M, Prior P (2005) How Complex is the “*Ralstonia solanacearum* Species Complex” In: Allen C, Prior P, Hayward A (ed) Bacterial wilt disease and the *Ral-*

stonia solanacearum species complex. American Phytopathological Society. St. Paul, MN, pp 449-462.

Fernández E, Gutarra L, Kreuze J (2015). Evaluación del gen que codifica la enzima β HPMEH para la inhibición de la marchitez bacteriana causada por *Ralstonia solanacearum*. Revista peruana de biología 22 (2): 193-198. doi: 10.15381/rpb.v22i2.11353

Ferreira V, Pianzola M, Vilaró F, Glaván G, Rodríguez M, Orellano E, Valls M, Siri M. 2017. Interspecific potato breeding lines display differential colonization patterns and induced defense responses after *Ralstonia solanacearum* infection. Frontiers in Plant Science. 8:1424. doi.org/10.3389/fpls.2017.01424.

Gaiero P, Mazzella C, Vilaró F, Speranza P, de Jong H (2017). Pairing analysis and in situ Hybridisation reveal autopolyploid-like behaviour in *Solanum commersonii* x *S. tuberosum* (potato) interspecific hybrids. Euphytica. 213: 137-142. doi:10.1007/s10681-017-1922-4

Galván G, Fraguas F, Quirici L, Santos L, Silvera E, Siri M, Villanueva P, Rauduvini L, González M, Torres D, Castillo A, Dalla Rizza M, Vilaró F, Gepp V, Ferreira F, Pianzola (2006) *Solanum commersonii*: una especie con gran potencial para el mejoramiento genético de papa por resistencia a *Ralstonia solanacearum*. Red de Recursos Genéticos del Cono Sur II 87-101.

Gao G, Qu D, Lian Y, Jin L, Feng L (2000). Identification molecular markers linked with resistance to bacterial wilt (*Ralstonia solanacearum*) in diploid potato. Acta Horticulturae Sinica. 27: 37-41.

Giambiasi M (2011) Análisis genético de la introgresión de germoplasma de *Solanum commersonii* en papa. Grade Dissertation, Universidad de la República, Uruguay.

González M (2010) Análisis de la resistencia a *Ralstonia solanacearum* en una progenie segregante de *Solanum commersonii*. MSc Dissertation, Universidad de la República, Uruguay.

González M, Galván G, Siri MI, Borges A, Vilaró F (2013). Resistencia a la marchitez bacteriana de la papa en *Solanum commersonii*. Agrociencia Uruguay 7: 45–54. On-line ISSN 2301-1548.

Gower J (1971) A General Coefficient of Similarity and Some of Its Properties. Biometrics 27 (4): 857-871. doi: 10.2307/2528823

Hawkes J. (1994) Origin of the cultivated potato and species relationship. In: Bradshaw J, Mackay G. Wallingford, UK (ed). Potato Genetics. pp 3-42.

Hayward A. (1991) Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. En: Annual Review of Phytopatology. 29: 65-87. doi:10.1146/annurev.py.29.090191.000433

Huamán Z. 2008. Descriptores morfológicos de la papa (*Solanum tuberosum* L.). CCBAT - Cabildo de Tenerife. ISBN: 978-84-87340-95-6.

Henry I, Dilkes B, Tyagi A, Lin H-Y, Comai L (2009) Dosage and parent-of-origin effects shaping aneuploidy swarms in *A. thaliana*. Heredity 103: 458-468. doi:10.1038/hdy.2009.81

Iovene M, Barone A, Frusciante L, Monti L, Carputo D (2004) Selection for aneuploid potato hybrids combining a low wild genome and resistance traits from *Solanum commersonii*. Theor Appl Genet 109: 1139-1146. doi: 10.1007/s00122-004-1741-6

Iwanaga M, Ortiz R, Cipar S, Peloquin S (1991) A restorer gene for genetic- cytoplasmic male sterility in cultivated potatoes. Am Potato J 68: 19-28. doi:10.1007/BF02893338

Jansky S (2006) Overcoming hybridization barriers in potato. *Plant Breed* 125:1–12. doi:10.1111/j.1439-0523.2006.01178.x

Johnston S, den Nijs T, Peloquin S, Hanneman R. (1980) The significance of genic balance to endosperm development in interspecific crosses. *Theor Appl Genet* 57 (1): 5-9. doi: 10.1007/BF00276002

Khush G (1973) Cytogenetics of aneuploids. Academic Press, Inc. New York, London.

Laferriere LT, Helgeson JP, Allen C (1999) Fertile *Solanum tuberosum* + *S. commersonii* somatic hybrids as sources of resistance to bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum*. *Theor Appl Genet* 98:1272–1278. doi:10.1007/s001220051193

Laurie D, Bennett M (1988) Cytological evidence for fertilization in hexaploid wheat x sorghum crosses. *Plant Breeding* 100: 73-82. doi: 10.1111/j.1439-0523.1988.tb00220.x

Micheletto S, Boland R, Huarte M (2000) Argentinian wild diploid *Solanum* species as sources of quantitative late blight resistance. *Theor Applied Genet* 101(5–6): 902–906. <http://doi.org/10.1007/s001220051560>

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. doi:10.1007/BF00022457

Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plantarum* 15: 473-497. doi: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x

Narancio R, Zorrilla P, Robello C, González M, Vilaró F, Pritsch C, Dalla Rissa M (2013) Insights on gene expression response of a characterized resistance genotype of *Solanum commersonii* Dun. Against *Ralstonia solanacearum*. *Eu J Plant Pathol* 136: 823-835. doi: 10.1007/s10658-013-0210-y

- Ono S, Sanetomo R, Hosaka K (2016) Genetic transmission of *Solanum demissum* ($2n = 6x = 72$) chromosomes from a pentaploid hybrid of *S. tuberosum* ($2n = 4x = 48$) into the aneuploid BC1 progeny. *Euphytica* 207:149–168. doi:10.1007/s10681-015-1558-1
- Patil V, Gopal J, Singh B (2012) Improvement for bacterial wilt resistance in potato by conventional and biotechnological approaches. *Agr Res* 1(4): 299-316. doi:10.1007/s40003-012-0034-6
- Peloquin S, Boiteux L, Carputo D (1999) Meiotic Mutants in Potato: Valuable Variants. *Genetics* 153(4): 1493-1499.
- Pijnacker L, ferwerda M, Puite K, Roest S (1987) Elimination of *Solanum phureja* nucleolar chromosomes in *S. tuberosum* + *S. phureja* somatic hybrids. *Theoret. Appl. Genetics* 73: 878-882. doi:10.1007/BF00289393
- RStudio Team (2015). RStudio: Integrated Development for R. RStudio, Inc., Boston, MA URL <http://www.rstudio.com/>. Consulted 03/05/2016.
- Sheltzer J, Torres E, Dunham M, Amon A (2012) Transcriptional consequence of aneuploidy. *PNAS* 109 (31): 12544-12649. doi:10.1073/pnas.1209227109
- Siri M, Galván G, Quirici L, Villanueva P, Ferreira F, Franco L, Pianzola M (2009). Molecular marker diversity and bacterial wilt resistance in wild *Solanum commersonii* accessions from Uruguay. *Euphytica*. 165: 371-382. doi: 10.1007/s10681-008-9800-8
- Siri M, Sanabria A, Pianzola M (2011) Genetic diversity and aggressiveness of *Ralstonia solanacearum* strains causing bacterial wilt of potato in Uruguay. *Plant Dis* 95 (10): 1293-1301. doi: 10.1094/PDIS-09-10-0626
- Smith E (1896) A bacterial disease of potato, pepper, eggplant and Irish potato (*Bacillus solanacearum* nov. sp). U.S Department of agriculture Div. vegetable physiology and pathology 12: 1-28.

Stelly D, Peloquin S (1986) Formation of 2n megagametophytes in diploid tuber-bearing solanums. *Am J of Bot* 73 (9): 1351-1363. <http://www.jstor.org/stable/2444069>. Consulted 30/03/2016.

Tung P, Hermesen J, Vander P, Schmiediche P (2006) Inheritance of resistance to *Pseudomonas solanacearum* in tetraploid potato. *Plant Breeding* 111: 23-30. doi:10.1111/j.1439-0523.1993.tb00603.x

Tung P (1992) Genetic variation for bacterial wilt resistance in a population of tetraploid potato. *Euphytica* 65: 73-80. doi:10.1007/BF00035549

Vilaró F, Plaisted R, Hoopes R (1989) Comparison of cytoplasmic male sterilities in progenies of Tuberosum x Andigena and Tuberosum x Neo-tuberosum crosses. *Am Potato J* 66: 13-24. 66: 13. doi:10.1007/BF02853485

Watanabe K, El-Nashaar H, Iwanaga M (1992) Transmission of bacterial wilt resistance by first division restitution (FDR) 2n pollen via 4x x 2x crosses in potatoes. *Euphytica* 60: 21-26. doi:10.1007/BF00022254

Yanping Z, Hui L, Hairui Z, Gao G (2014) Identification and utility of sequence related amplified polymorphism (SRAP) markers linked to bacterial wilt resistance genes in potato. *Afr J Biotechnol* 13 (12): 1314-1322. doi: 10.5897/AJB2013.13021

Yuliar, Asi Nion Y, Toyota K (2015) Recent trends in control methods for bacterial wilt diseases caused by *Ralstonia solanacearum*. *Microbes Environ* 30 (1): 1-11. doi.org/10.1264/jsme2.ME14144

2.8 ANNEXES

Annex 1.

Table 1 Quantitative and Qualitative variables and their states recorded in the study material.

QUANTITATIVE VARIABLE		
Variable	Abbreviation	Unit
Chromosome number	Chro	---
Plant height	Hpla	cm
Leaf width	Wleaf	mm
Leaf Length	Lleaf	mm
Terminal leaflet length	LTlet	mm
Ratio of between leaf length to terminal leaflet length	Lleaf/LTlet	---
Number of lateral leaflets	NLlet	---
Terminal leaflet width	WTlet	mm
Lateral leaflet length	LLlet	mm
Ratio of terminal leaflet length to terminal leaflet width	LTlet/WTlet	---
Ratio of between terminal leaflet length to lateral leaflet length	LTlet /LLlet	---
Number of foliulos	Nfou	---
Stem diameter	Ds	mm
Number of tubers per plant	Ntub	---
Tuber weight	Wtub	gr
Yield per plant	Yplan	gr
Dry matter	DM	%
Flower diameter	Dflo	cm
Flower shape (distance petal apex from flower center / petal base to flower center)	Rflo	---
Days to anthesis	Dant	days
Cycle length	CL	days

QUALITATIVE VARIABLE		
Variable	Abbreviation	State
Plant vigor	Vplan	1: Little vigorous, 5: Very vigorous
Flower shape	Fflo	1: stellate, 2: semi stellate, 3: pentagonal, 4: rotate
Flower color	Cflo	1: white, 2:white with violet traces, 3:white with light violet, 4: violet
Stem color	Cstem	1: green, 2: green with few violet spots, 3: green with many violet spots, 4: violaceous
Stem pilosity	Pstem	1: little, 2: median, 3: abundant
Petiole color	Cpet	1: green, 2: green with violet, 3: violet
Leaf axilar color	Clax	1: green, 2: light violet, 3: dark violet
Tuber skin color	Ctub	1: white, 2: light rose, 3: rose, 4: dark rose, 5: purple, 6: dark purple
Eyes depth	Deye	1: superficial (<2mm), 2: median (2-3mm), 3: deep (>3mm)
Post harvest conservation	PHc	1: Little sprout, 5: Very sprouted and dehydrated
Resitance to <i>R. solanaceraum</i>	RR	1: Moderately resistant, 2: Moderately suseptible, 3: Suseptible
Stolon length and persistence	LPsto	1: long and persistent, 2: long and not persistent, 3: medium long and persistent, medium long and not persistent, 5: short and persistent, 6 short and not persistent

3. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES GENERALES

S. commersonii es una Solanácea silvestre originaria de Uruguay, sur de Brasil y la Mesopotamia Argentina, con gran potencial para el mejoramiento genético de la papa cultivada, dadas las muchas características deseables de incorporar al cultivo que posee. Entre estas muchas ventajas se reconocen la resistencia a enfermedades de relevancia económica como la marchitez bacteriana causada por *R. solanacearum*. Mediante un esquema simple de hibridación y retrocruzamientos diseñado y utilizado por INIA en el programa de mejoramiento de papa, que hace especial énfasis en el aprovechamiento de los gametos no reducidos frecuentemente producidos por esta especie, se está logrando incorporar la resistencia al marchitamiento bacteriano desde *S. commersonii* a la base genética de *S. tuberosum*.

El presente estudio realizado en una población de individuos de una tercera retrocruza del esquema de cruzamiento realizado (Fig 2), revela que aunque existe una amplia segregación en la progenie evaluada en cuanto a número cromosómico, morfología, fisiología, comportamiento agronómico y resistencia a la enfermedad, hay una marcada tendencia a que los individuos se parezcan a los parentales recurrentes y a RC₂.

El patrón de herencia de tipo transgresivo que continúa mostrando la resistencia a *R. solanacearum*, al igual que había reportado González (2010) para F₁, RC₁ y RC₂ de este mismo esquema de cruzamientos, hace posible encontrar individuos con niveles medios de resistencia a la enfermedad, aun partiendo de un genotipo de *S. commersonii* medianamente susceptible a la enfermedad. Este tipo de comportamiento de la resistencia postula un control poligénico o cuantitativo de la enfermedad (Watanabe *et al.*, 1999), lo cual es altamente deseable desde el punto de vista del mejoramiento de los cultivos, por tratarse de un tipo de resistencia más duradero en el tiempo debido a la menor presión de selección que se ejerce sobre el patógeno (Micheletto *et al.*, 2000). A su vez, la ausencia de la bacteria en tallos y tubérculos de algunos individuos asintomáticos de este cruzamiento que fueron inoculados (Ferreira *et al.*, 2017)

potencia el beneficio del uso de la especie como donante de resistencia para *R. solanacearum*, permitiendo no sólo disminuir los niveles de infección del cultivo, sino también frenar su dispersión a través de los tubérculos semilla.

Del análisis citogenético se concluye que, a diferencia de una alta frecuencia de genotipos con 52 cromosomas esperados bajo una segregación cromosómica normal en ambos parentales tbr ($2n = 48$) y RC₂ ($2n = 56$), el 52 % de los individuos de esta progenie presentó números cromosómicos entre 47 y 49, lo cual deja en evidencia un mecanismo temprano de selección a favor de individuos con ploidías similares a los parentales recurrentes ($2n = 48$). Si bien el mecanismo aún no se dilucida y se desconoce el nivel de euploidía de estos individuos, se presume que el NBE de los gametos puede tener un rol importante en este mecanismo (Carputo, 1999). En base a lo observado, todo parece indicar que aquellos gametos RC₂ con NBE cercano al NBE de los gametos del parental recurrente ($n=2$ NBE), cumplieron con la relación 2: 1 estipulada por Johnston *et al.* (1980) y por lo tanto predominaron en número de semillas exitosas originadas con respecto a aquellos gametos con mayores o menores ploidías.

El análisis de características morfológicas y fisiológicas mostró que, a pesar de la diversidad en formas y comportamiento fenológico que muestran los individuos, algunas características parecen estar asociadas con uno u otro progenitor. Por ejemplo, floraciones tardías, formas de flor estrelladas, mayor relación entre largo y ancho del folíolo terminal, ciclos largos y mayor número de tubérculos por planta son característicos de *S. commersonii*. Por otro lado, plantas vigorosas con flores rotadas y ciclos cortos tienen una fuerte relación con mayor peso de los tubérculos y mayor rendimiento, son características de *S. tuberosum* subsp. *tuberosum*. Este tipo de asociación entre estados de caracteres posibilita su uso como marcadores morfológicos, lo que permitiría pronosticar el comportamiento agronómico de los individuos. También serán útiles para asistir, junto a otro tipo de marcadores como los moleculares, a la selección de individuos en las primeras etapas de desarrollo de las plantas, cuando se está trabajando en programas de mejoramiento con híbridos entre *S. commersonii* y *S. tuberosum* subsp. *tuberosum*.

Por otra parte, todo indica que existe una fuerte relación entre el desempeño agronómico, número de cromosomas y el largo del ciclo de los híbridos. Si bien no se observó una correlación significativa entre número cromosómico y largo de ciclo, al aumentar ambos factores, el rendimiento por planta se vio afectado negativamente. Dado que no se encontraron diferencias significativas entre individuos con distintas ploidías, todos los individuos rindieron menos que los parentales tbr utilizados y la mayoría presentó ciclos productivos más largos que éstos, el efecto sobre el rendimiento no parece estar dado por un problema fisiológico a nivel celular por contener más o menos cromosomas como postularon Sheltzer *et al.* (2012), sino a un mayor o menor contenido de genoma silvestre. En trabajos con híbridos interespecíficos *S. demissum* x tbr Ono *et al.* (2016), concluyen, mediante marcadores moleculares, que el número cromosómico puede ser indicativo del contenido de genoma silvestre. De este modo, en este trabajo podríamos inferir que aquellos individuos con mayor número de cromosomas podrían contener mayor cantidad de genoma silvestre y por consiguiente tener ciclos productivos similares a *S. commersonii*, lo cual los hace poco adaptados la producción comercial de papa en las zonas de clima templado como Uruguay. Este comportamiento agronómico de los híbridos plantea la necesidad de continuar con el esquema de retrocruzas, a fin de lograr genotipos más adaptados a nuestras condiciones y debe ser considerado en futuros diseños experimentales, con el fin de evaluar la contribución de esta especie silvestre en los híbridos y seleccionar genotipos de acuerdo a características agronómicas como el rendimiento y el tamaño del tubérculo.

Otras de las características evaluadas de relevancia para la continuidad y direccionalidad de los futuros cruzamientos, fue la fertilidad del polen. Si bien la fertilidad esperada era baja, debido a la baja viabilidad de polen observado en ambos parentales, los resultados mostraron que, a excepción de un individuo, todos resultaron machoes-tériles. En función de los muchos antecedentes observados en cruzamientos interespecíficos entre *S. tuberosum* y sus parientes silvestres, incluido *S. commersonii* (Hanneman y Peloquin 1981, Vilaró *et al.* 1989, Iwanaga *et al.* 1991, Camadro *et al.* 2004), la explicación parece estar dada por la interacción entre los citoplasmas sil-

vestre y cultivado, siendo este un caso típico de machoesterilidad citoplasmática. Esta posibilidad hace pensar en la necesidad de tener en cuenta, no sólo los materiales parentales utilizados, sino también la direccionalidad de los cruzamientos en el futuro.

Por último, la existencia de individuos con ploidías cercanas a $2n = 48$, morfológica y fisiológicamente similares a tbr y con niveles de resistencia a *R. solanacearum* iguales o superiores a los observados en el padre donante, postula la existencia de introgresión del germoplasma de *S. commersonii* en el genoma de *S. tuberosum* subsp. *tuberosum*. Observaciones de apareamiento homoeólogo y configuraciones multivalentes durante la meiosis masculina de F_1 , RC_1 y RC_2 a partir de este esquema de retrocruzamiento realizadas por Gaiero *et al.* (2017), también apuntan hacia la introgresión. El logro de la introgresión significa que este tipo de metodología de cruzamiento es adecuada para introducir resistencia a la marchitez bacteriana desde *S. commersonii* en papa y puede ser replicada cuando sea necesario para potenciar el uso de esta especie en el mejoramiento del cultivo.

La simplicidad y funcionalidad del esquema de cruzamiento utilizado, así como los prometedores resultados obtenidos en este y otros trabajos realizados, señalan a *S. commersonii* como uno de las solanáceas silvestres más prometedoras para el mejoramiento del cultivo de papa. La ubicación estratégica de Uruguay en el centro de origen y diversidad de la especie le brinda la ventaja comparativa de contar con la máxima diversidad y disponibilidad de este valioso recurso genético para incorporar resistencia a *R. solanacearum* y otras muchas características deseables para al cultivo. Esto hace necesario un mayor conocimiento de su diversidad desde el punto de vista agronómico, por lo cual estudios fenológicos y morfológicos direccionados a caracterizar las colecciones en cuanto a largos de ciclos, contenidos de materia seca de los tubérculos, resistencia a factores ambientales adversos como sequía, contenido de glicoalcaloides entre otras, deberán ser considerados. A su vez, el estudio con marcadores moleculares permitiría elucidar algunos aspectos interesantes del comportamiento entre estos dos genomas, como el mecanismo de eliminación de cromosomas, la relación del número de cromosomas con la resistencia de *R. solanacearum*

y el contenido de genoma silvestre, así como el ligamiento entre caracteres deseables y no deseables, ampliando así las posibilidades de uso de *S. commersonii* y su diversidad genética en términos de resistencia a *R. solanacearum* y otras características buscadas de esta especie.

4. **BIBLIOGRAFÍA**

- 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.
- Bedonni C, Camadro E. 2009. Morphological and molecular evidence of natural interspecific hybridization in the diploid potato *Solanum kurtzianum* from Argentina. *Botany*. 87(1): 78-87.
- Birch P, Bryan G, Fenton B, Gilroy E. 2012. Crops that feed the world: 8: Potato are the trends of increased global production sustainable?. *Food Security*. 4 (4): 477-508.
- Bradeen J, Haynes K. 2011. Introduction to potato. En: Bradeen J and Kole C. (Eds). *Genetics, genomics and breeding of potato*, Enfield: Science Publishers. 2-15.
- Bradshaw J, Bonierbale M. 2010. Potatoes. In: Bradshaw JE. (Eds.) *Root and tuber crops. Handbook of Plant Breeding*. London: Springer New York Dordrecht Heidelberg. 7: 1-52.
- Bradshaw J. 2009. A genetic perspective on yield plateau in potato. *Potato Journal*. 36 (3-4): 79-94.
- Bradshaw J, Bryan G, Ramsay G. 2006. Genetic resources (including wild and cultivated *Solanum* species) and progress in their utilization in potato breeding. *Potato Research*. 49: 49-65.
- Camadro E, Carputo D, Peloquin S. 2004. Substitutes for genome differentiation in tuber- bearing *Solanum*: interespecific pollen-pistil incompatibility, nuclear-cytoplasmic male sterility, and endosperm. *Theoretical and Applied Genetics*. 109: 1369-1376.
- Camadro E, Verde L, Marcellian O. 1998. Pollen – pistil incompatibility in a diploid hybrid potato population with cultivated and wild germoplasm. *American Journal of Potato*. 75 (2): 81-85.

- Cardi T, Iannamico V, D'Ambrosio F, Filippone E, Lurquin P. 1993. In vitro regeneration and cytological characterization of shoots from leaf explants of three accessions of *S. commersonii*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 34 (1):107–114.
- Carputo D, Frusciante L. 2011. Classical genetics and traditional breeding. En: Bradeen J and Kole C. (Eds). *Genetics, genomics and breeding of potato*, Enfield: Science Publishers. 20–40.
- 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, Parisi M, Consiglio F, Iovene M, Caruso G, Monti L, Frusciante L. 2003. Aneuploid hybrids from 5x – 4x crosses in potato: Chromosome number, fertility, morphology and yield. *American Journal of Potato Research*. 80:93-101.
- Carputo D, Frusciante L, Monti L, Parisi M, Barone A. 2002. Tuber quality and soft rot resistance of hybrids between *Solanum tuberosum* and the incongruent wild relative *S. commersonii*. *American Journal of Potato Research*. 79: 345-352.
- 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. 1999. Post-zigotic gametic selection due to endosperm balance number explains unusual chromosome number of 3x x 2x progeny in *Solanum*. *Sexual Plant Reproduction*. 12: 27-31.
- Carputo D, Barone A, Cardi T, Sebastiano A, Frusciante L, Peloquin S. 1997. Endosperm balance number manipulation for direct in vivo germoplasm introgression to potato from a sexually isolated relative (*Solanum commersonii* Dun). *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 94: 12013-12017.

- Carputo D, Cardi T, Frusciante L, Peloquin S. 1995. Male fertility and cytology of triploid hybrids between tetraploid *Solanum commersonii* ($2n=4x=48$, 2EBN) and Phureja-Tuberosum haploid hybrids ($2n=2x=24$, 2EBN). *Euphytica*. 83(2): 123-129.
- Clausen A, Colavita M, Butzonitch I, Carranza A. 2005. A potato collecting expedition in the province of Jujuy, Argentina and disease indexing of virus and fungus pathogens in Andean cultivars. *Genetic Resources and Crop Evolution*. 52(8): 1099-1109.
- Correll D. 1962. The potato and its wild relatives. In: Contributions from the Texas Research Foundation. Botanical Studies. Library Licensing. 517 p.
- Chen Y, Palta J, Bamberg J. 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: 101-107.
- DIEA (Dirección de Estadísticas Agropecuarias).2015. Producción [En línea]. En: Anuario estadístico agropecuario. 2015. Montevideo: MGAP (Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca). Consultado 15 abril 2016. en <http://www.mgap.gub.uy/unidad-ejecutora/oficina-de-programacion-y-politicas-agropecuarias/publicaciones/anuarios-diea/anuario2015>.
- Fegan M, 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. eds. Minnesota, USA. APS Press. 449-462.
- Fernández E, Gutarra L, Kreuze J. 2015. Evaluación del gen que codifica la enzima β HPMEH para la inhibición de la marchitez bacteriana causada por *Ralstonia solanacearum*. *Revista peruana de biología*. 22 (2): 193-198.
- Ferreira V, Pianzola M, Vilaró F, Glaván G, Rodríguez M, Orellano E, Valls M, Siri M. 2017. Interspecific potato breeding lines display differential colonization

- patterns and induced defense responses after *Ralstonia solanacearum* infection. *Frontiers in Plant Science*. 8:1424.
- Galván G, Fraguas F, Quirici L, Santos L, Silvera E, Siri M, Villanueva P, Rauduviniche L, González M, Torres D, Castillo A, Dalla Rizza M, Vilaró F, Gepp V, Ferreira F, Pianzola M. 2006. *Solanum commersonii*: una especie con gran potencial para el mejoramiento genético de papa por resistencia a *Ralstonia solanacearum*. *Red de Recursos Genéticos del Cono Sur*. 87-101.
- Gaiero P, Mazzella C, Vilaró F, Speranza P, De Jong H. 2017. Pairing analysis and in situ Hybridisation reveal autopolyploid-like behaviour in *Solanum commersonii* x *S. tuberosum* (potato) interspecific hybrids. *Euphytica*. 213 (7): 137-142.
- González M. 2010. La Resistencia a la marchitez bacteriana de *Solanum commersonii* Dun. Y su utilización en el mejoramiento genético de papa. Master thesis. Montevideo, Uruguay. Facultad de Agronomía-Udelar. 97 pp.
- González M, Galván G, Siri M, Borges A, Vilaró F. 2013. Resistencia a la marchitez bacteriana de la papa en *Solanum commersonii* Dun. *Agrociencia Uruguay*. 17 (1): 45-54.
- Grun P. 1990. The evolution of cultivated potatoes. *Economic Botany*. 44(3): 39-55.
- Guarisch Sousa R, Puigvert M, Coll N, Siri M, Pianzola M, Valls M, Setubal J. 2016. Complete genome sequence of the potato pathogen *Ralstonia solanacearum* UY031. *Standards in Genomic Sciences*. 11: 7.
- Hanneman R. 1994. Assignment of endosperm balance numbers to the tuber-bearing *Solanums* and their close non-tuber-bearing relatives. *Euphytica*. 74 (1-2):19-25.
- Hanneman R. 1989. The potato germplasm resource. *American Journal of Potato Research*. 66 (10): 655-667.

- Hanneman R, Peloquin S. 1981. Genetic-cytoplasmic male sterility in progeny of 4x-2x crosses in cultivated potatoes. *Theoretical and Applied Genetics*. 59: 53-55.
- Hawkes J. 1994. Origin of the cultivated potato and species relationship. In: *Potato Genetics*. Bradshaw J, Mackay G. (Eds). Wallingford. CAB International. 3-42.
- Hawkes J. 1990. *The potato: evolution, biodiversity and genetic resources*. London, Belhaven Press. 259 pp.
- Hayward A. 1991. Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. En: *Annual Review of Phytopathology*. 29: 65-87.
- Hermesen J. 1994. Introgression of genes from wild species, including molecular and cellular approaches. En: Bradshaw J and Mackay G. (Eds.) *Potato genetics*. CAB International, Wallingford. 515-538.
- Iorizzo M, Aversano R, Bradeen J, Frusciante L and Carputo D. 2011. Fertilization fitness and offspring ploidy in 3x62x matings in potato. *Plant Biosystems*. 1: 1-5.
- Iovene M, Barone A, Frusciante L, Monti L, Carputo D. 2004. Selection for aneuploid potato hybrids combining a low wild genome and resistance traits from *Solanum commersonii*. *Theoretical and Applied Genetics*. 109: 1139-1146.
- Iwanaga M, Ortiz R, Cipar S, Peloquin S. 1991. A restorer gene for genetic- cytoplasmic male sterility in cultivated potatoes. *American Potato Journal*. 68: 19-28.
- Jansky S. 2006. Overcoming hybridization barriers in potato. *Plant Breeding*. 125: 1-12.
- Johnston S, den Nijs T, Peloquin S, Hanneman R. 1980. The significance of genic balance to endosperm development in interspecific crosses. *Theoretical and Applied Genetics*. 57 (1): 5-9.
- Johnston S y Hanneman R. 1980. Support of the endosperm balance hypothesis utilizing some tuber-bearing *Solanum* species. *American Potato Journal*. 57: 7-14.

- Laferriere L, Helgeson J, Allen C. 1999. Fertile *Solanum tuberosum* + *S. commersonii* somatic hybrids as sources of resistance to bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum*. Theoretical and Applied Genetics. 98: 1272-1278.
- Matsubayashi M. 1991. Phylogenetic relationships in the potato and its relatives species. In: Tsuchiya T, Gupta P (eds). Chromosome engineering in plants: genetics, breeding, evolution. Part B. Elsevier, Amsterdam. pp 93-118.
- Micheletto S, Boland R, Huarte M. 2000. Argentinian wild diploid *Solanum* species as sources of quantitative late blight resistance. Theoretical and Applied Genetics. 101: 902-906.
- Mwangi J, Nyende A, Demo P, Matiru V. 2008. Detection of latent infection by *Ralstonia solanacearum* in potato (*Solanum tuberosum*) using stems instead of tubers. African Journal of Biotechnology. 7 (11): 1644-1649.
- Ono S, Sanetomo R, Hosaka K. 2016. Genetic transmission of *Solanum demissum* ($2n = 6x = 72$) chromosomes from a pentaploid hybrid of *S. tuberosum* ($2n = 4x = 48$) into the aneuploid BC₁ progeny. Euphytica 207:149-168.
- Patil V, Gopal J, Singh B. 2012. Improvement for bacterial wilt resistance in potato by conventional and biotechnological approaches. Agricultural Research. 1(4): 299-316.
- Peloquin S, Yerk G, Werner J, Darms E. 1989. Potato breeding with haploids and 2n gametes. Genome. 31(2): 1000-1004.
- Prieto A, Ispizúa VN, Clausen A. 2016. Distribución y variabilidad morfológica de poblaciones de *Solanum commersonii* (Solanaceae) en la región pampeana de la Argentina. Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica. 51 (1): 59-71.
- Safni I, Cleenwerck I, De Vos P, Fegan M, Sly L. and Kappler U. 2014. Polyphasic taxonomic revision of the *Ralstonia solanacearum* species complex: proposal to emend the descriptions of *Ralstonia solanacearum* and *Ralstonia syzygii* and reclassify current *R. syzygii* strains as *Ralstonia syzygii* subsp. *syzygii* subsp.

nov., *R. solanacearum* phylotype IV strains as *Ralstonia syzygii* subsp. *indonesiensis* subsp. nov., banana blood disease bacterium strains as *Ralstonia syzygii* subsp. *celebesensis* subsp. nov. and *R. solanacearum* phylotype I and III strains as *Ralstonia pseudosolanacearum* sp. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 64:3087-3103.

Sanabria A, Siri M, Cecchetto G, Pianzola M. 2012. Aplicación de la técnica de PCR en la detección de *Ralstonia solanacearum* en campos papeiros. Innotec. 7: 49-54.

Sheltzer J, Torres E, Dunham M, Amon A. 2012. Transcriptional consequence of aneuploidy. PNAS 109 (31): 12544-12649.

Siri M, Sanabria A, Pianzola M. 2011. Genetic diversity and aggressiveness of *Ralstonia solanacearum* strains causing bacterial wilt of potato in Uruguay. Plant Disease. 95 (10): 1293-1301.

Siri M, Galván G, Quirici L, Silvera E, Villanueva P, Ferreira F, Pianzola M. 2009. Molecular marker diversity and bacterial wilt resistance in wild *Solanum comersonii* accessions from Uruguay. Euphytica. 165(2): 371.

Smith E. 1896. A bacterial disease of potato, pepper, eggplant and Irish potato (*Bacillus solanacearum* nov. sp). U.S Department of agriculture Div. vegetable physiology and pathology.12: 1-28.

Spooner D, Ghislain M, Simon R, Jansky S, Gavrilenko T. 2014. Systematics, diversity, genetics and evolution of wild and cultivated potatoes. The Botanical Review. 80 (4): 283-383.

Spooner D, Nuñez J, Trujillo G, del Rosario Herrera M, Guzmán F, Ghislain M. 2007. Extensive simple sequence repeat genotyping of potato landraces supports a major reevaluation of their gene pool structure and classification. Proceeding of the National academy of Sciences. 104 (49): 19398-19403.

Tung P, Hermesen J, Vander P, Schmiediche P. 2006. Inheritance of resistance to *Pseudomonas solanacearum* in tetraploid potato. Plant Breeding. 111: 23-30.

- Vázquez A, González F, Ferreira P, Monya and Kenne L. 1997. Glycoalkaloids of *Solanum commersonii* Dun. Ex Poir Euphytica. 95: 195-201
- Vilaró F, Plaisted R, Hoopes R. 1989. Comparison of cytoplasmic male sterilities in progenies of Tuberosum x Andigena and Tuberosum x Neo-tuberosum crosses. American Potato Journal. 66: 13-24.
- Watanabe K, El- Nashaar H, Iwanaga M. 1992. Transmission of bacterial wilt resistance by first division restitution (FDR) 2n pollen via 4x x 2x crosses in potatoes. Euphytica 60: 21-26.
- Yuliar, Asi Nion Y, Toyota K. 2015. Recent trends in control methods for bacterial wilt diseases caused by *Ralstonia solanacearum*. Microbes Environ. 30 (1): 1-11.
- Zuluaga A, Ferreira V, Pianzola M, Siri M, Coll N, Valls M. 2014. A novel, sensitive method to evaluate potato germoplasm bacterial wilt resistance using a luminescent *Ralstonia solanacearum* reporter strain. Molecular Plant –Microbe Interactions. 27 (3): 277-285.