

Selección asistida por marcadores para la detección de
resistencia extrema a PVY
en *Solanum tuberosum*

Autor

Diego Torres Dini

Orientadores:

Marco Dalla Rizza – Francisco Vilaró

Diciembre 2004



OBJETIVO	20
MATERIALES Y MÉTODOS	21
Genotipos empleados	21
Extracción de ADN	21
Condiciones de PCR	24
<i>Marcador RYSC3</i>	24
<i>Marcador M45</i>	25
Electroforesis	26
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	27
CONCLUSIÓN	32
BIBLIOGRAFÍA	33

AGRADECIMIENTOS

A mis orientadores, Marco Dalla Rizza y Francisco Vilaró de INIA, Las Brujas, por la formación y el gran apoyo brindado, sin los cuales este trabajo no hubiese sido posible. A Sabina Vidal de Facultad de Ciencias por ceder gentilmente los cebadores para RYSC3 junto con sus correspondientes genotipos control, a Marc Gishlain del Centro internacional de la papa (CIP) por la información brindada sobre el marcador M45 y Meredith Bonierbale del CIP por la genealogía del clon CIP 94138,1 y por ceder una versión preliminar del artículo de Bodgan Flis sobre el gen *Ry-f_{sto}*.

Detección de resistencia extrema a PVY en *Solanum tuberosum* L.

RESUMEN

El virus Y de la papa (PVY) es el segundo patógeno viral más importante a nivel mundial y la principal causa de degeneración de la semilla en Uruguay. Dos genes simples dominantes confieren resistencia extrema (ER) a PVY en papa, el gen *Ry_{adg}* derivado de *S. tuberosum subsp. andígena* y el gen *Ry_{sto}* derivado de *S. stoloniferum*, siendo los más empleados en los programas de mejoramiento genético. Ambos se ubican en la misma región del cromosoma XI, y junto con otros genes de resistencia integran una región rica en este tipo de genes. La presencia de estos genes fue testada en 46 variedades y clones del programa de mejoramiento de papa de INIA y de otros orígenes.

Para la detección de *Ry_{adg}* se utilizó el marcador SCAR RYSC3 que fue evidenciado en 19 genotipos, mientras que el empleo del marcador M45 permitió revelar la presencia de *Ry_{sto}* en un genotipo, contabilizando un total de 20 genotipos inmunes a PVY. Además, se comprobó que el marcador M45 resulta eficiente para testar la presencia de *Ry_{adg}* y no solamente la de *Ry_{sto}* para el cual había sido reportado por Brigneti et al. en 1997. Esta capacidad de identificar simultáneamente ambas fuentes de resistencia extrema, lo destaca como una herramienta eficiente y práctica para la selección de progenitores resistentes al virus Y, y a diferencia de otras metodologías no requiere de endonucleasas de restricción lo que permite reducir los costos y el tiempo de estudio. Del trabajo realizado resulta relevante el alto porcentaje de genotipos locales resistentes, evidenciando el interés prestado en el programa en incorporar este tipo de resistencia en sus variedades, ya que el mismo confiere una protección efectiva contra todas las cepas de PVY.

INTRODUCCIÓN

La papa (*Solanum tuberosum ssp. tuberosum* L.) es el cuarto cultivo alimenticio en importancia mundial luego del trigo, el maíz y el arroz. La producción anual se calcula en 300 millones de toneladas. Sin embargo se estima que el potencial productivo excedería los 400 millones de toneladas si las enfermedades que reducen la cosecha fueran controladas.

Las virosis en papa son un problema grave causando grandes pérdidas en la producción, no solo por los efectos causados por la infección primaria, sino también porque este cultivo se propaga vegetativamente y esto hace que a partir de los tubérculos infectados se produzca una segunda generación de papas afectadas.

El virus Y de la papa (Potato virus Y; PVY) fue descrito por primera vez por Smith en 1931 en papas infectadas, y es considerado como miembro de los *Potyvirus*, incluido en la familia *Potiviridae*. Este virus infecta un gran número de especies, incluyendo además de papa otras especies de importancia económica como tomate y pimienta (Arnedo-Andrés *et al.* 2002). Se le considera de distribución mundial y también puede ser frecuente en algunas zonas frías y altas donde la temperatura es favorable para el desarrollo de ciertas poblaciones de áfidos (Franco *et al.* 2002).

Debido a su fácil diseminación es el segundo virus más importante a nivel mundial luego de PLRV y el primero a nivel nacional. Puede ocasionar importantes pérdidas en la producción, pudiendo reducir el rendimiento hasta un 30% en la primera generación y un 80% en la segunda; combinado con otros virus puede causar la muerte de la planta (Vilaró *com pers*). Estos daños obligan a la renovación de semilla, y es por ello que en Uruguay se importan anualmente de 2 a 3 millones de dólares en semilla certificada lo cual representa una parte significativa del costo del cultivo. Por esta razón el número de multiplicaciones que pueda realizar un productor sin que se alcance una infección importante es decisivo en su economía y en la rentabilidad del cultivo (Galván 1991).

La estrategia para controlar a PVY se ha dirigido principalmente a desarrollar nuevas variedades de papa genéticamente resistentes por medio de cruzamientos entre genotipos silvestres resistentes y variedades domesticadas con características de interés comercial (Gebhardt & Valkonen 2001). En Uruguay desde la década del 80 se están desarrollando variedades nacionales y en los 90 se liberó la variedad nacional Iporá, que mantiene resistencia efectiva contra PVY y PLRV viabilizando la producción nacional de semilla, principal insumo del cultivo (Galván 1991).

El avance de las técnicas de biología molecular ha permitido potenciar los programas de mejoramiento genético, permitiendo determinar características de interés y analizando directamente los genes responsables de las mismas. Actualmente han sido mapeados dos genes simples dominantes de resistencia extrema a PVY, el gen Ry_{adg} derivado de *S. tuberosum subsp. andigena* (Leister *et al.* 1996) y el gen Ry_{sto} derivado de *S. stoloniferum* (Brigneti *et al.* 1997)

Descripción del Virus Y (PVY)

El PVY pertenece al género *Potyvirus* incluido en la familia *Potyviridae*. Los viriones de los Potyvirus consisten en una sola partícula filamentosa flexible de 12 a 15 nm de diámetro y de 680 a 900 nm de longitud. El genoma del PVY está formado por un único ARN de cadena simple, de polaridad positiva y de alrededor de 10,4 kb (Agrios 1999).

Principales cepas

Existen diferentes cepas de PVY: PVY^O es la cepa común (del inglés: “Ordinary strain”); PVY^N es la cepa necrótica (del inglés: “Necrotic strain”) la cual si bien es leve en papa, se expande con velocidad en el cultivo; PVY^{NTN} (del inglés: “Necrosis Tuber”) es una variante de PVY^N que causa necrosis en los tubérculos. La cepa NTN fue encontrada por primera vez en Hungría en 1970 y se ha expandido a través de Europa. También fue encontrada en Canadá en 1996 y en EEUU en el 2001. Análisis moleculares demostraron que las cepas de NTN europea y norteamericana son diferentes, y se piensa que la cepa de EEUU surgió independientemente de la europea como un nuevo recombinante entre PVY^N de Canadá y el PVY^O común. Hay evidencia de que nuevos recombinantes entre N y O continúan desarrollándose en EEUU, y algunas de esas nuevas cepas de PVY se designan como PVY^{N:O} (Secor *et al.* 2004).

Transmisión

Este virus se transmite por áfidos frente a los cuales los pesticidas no han sido lo suficientemente exitosos como para controlar la expansión en el cultivo (Gebhardt & Valkonen 2001). El virus se disemina en forma no persistente, siendo el áfido *Myzus persicae* el vector más eficiente y el responsable de la mayor parte de infecciones en el campo, existiendo además otras especies de áfidos (Franco *et al.* 2002).

En la transmisión no persistente los insectos con partes bucales succionadoras, adquieren los virus al alimentarse de una planta infectada, portándolos en sus estiletes. Los virus son

transmitidos a una planta sana ubicada en la proximidad cuando el áfido se alimenta de ella, transfiriendo así los viriones que había adquirido previamente. Generalmente los áfidos sólo transmiten la virosis durante una hora después de haber adquirido el virus y el tiempo óptimo de adquisición para que el pulgón sea infectivo es de 15 a 60 segundos (Agrios 1999).

En plantas susceptibles, la transmisión sigue el modelo general para los virus; en un primer momento infecta la parte donde se encuentra el punto de entrada y posteriormente se mueve célula a célula hasta llegar a los ápices, desde donde a través del sistema vascular, se extiende a toda la planta, alcanzando incluso los tubérculos. Dado que este cultivo se propaga vegetativamente la siguiente generación resulta infectada y esto constituye un tipo de transmisión por propagación vegetativa (DiFonzo *et al.* 1996).

Sintomatología

Los síntomas varían según la cepa del virus, interacción con otros virus y la variedad de papa. En general en el primer o segundo año se suele observar mosaico solo o acompañado con rugosidad y encrespamiento (Figura 1), mostrar necrosis severa, e incluso puede ser asintomática. PVY^N es actualmente la cepa más difundida, induce síntomas de moteado poco definido en infecciones primarias y secundarias. PVY^O era la cepa más común y los síntomas primarios que causa son moteado o amarillamiento de los folíolos y necrosis que puede estar restringida a algunas nervaduras por el lado del envés o puede ser una necrosis que comienza como manchas o anillos que progresan hasta que produce el colapso de las hojas las cuales se desprenden y caen o permanecen colgadas del tallo. Si la infección es tardía los síntomas pueden estar ausentes pero los tubérculos de estas plantas resultan infectados. Los síntomas secundarios se presentan como un fuerte enanismo, mosaico y encrespamiento o rugosidad de las hojas. A veces se observa necrosis del tallo y follaje. La necrosis es generalmente más severa en infección primaria que secundaria. PVY^{NTN} produce necrosis en los tubérculos causando graves pérdidas económicas (Franco *et al.* 2002).



Figura 1. Arriba: INIA Iporá, una variedad nacional inmune al Virus Y. Abajo: Atlantic, una variedad con síntomas de rugosidad y encrespamiento.

Generalidades de los genes R de Plantas

Modelo de Flor “gen por gen”

Las bases genéticas de la resistencia a patógenos en plantas fueron descritas inicialmente por Flor (1953 y 1971) quien formuló la hipótesis de “gen por gen”; este modelo es la base teórica que permite una mejor comprensión de las interacciones entre las plantas y sus patógenos. Muchas de estas interacciones son definidas como incompatibles y están controladas por la interacción entre el producto de un gen de resistencia de la planta (genes *R*) y sus correspondientes codificados por el patógeno conocidos como genes de avirulencia (genes *Avr*). Cuando las proteínas de resistencia codificadas por los genes *R* (proteínas *R*) interactúan específicamente con las proteínas de avirulencia del patógeno se produce un reconocimiento específico, que desencadena una cascada de activación de los genes del hospedador que conduce a una inhibición del crecimiento del patógeno (Figura 2). Cuando el reconocimiento entre la proteína de resistencia y su respectivo ligando no ocurre, se está frente a una interacción de tipo compatible y se produce la enfermedad (Staskawicz *et al.* 1995).

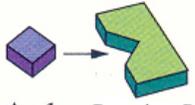
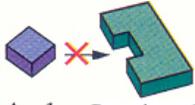
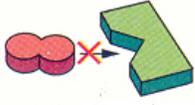
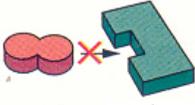
Genotipo del Patógeno	Genotipo de la Planta	
	<i>R1</i>	<i>r1</i>
<i>Avr1</i>	 <p>Avr1 Proteína <i>R1</i></p> <p>Resistencia Interacción incompatible</p>	 <p>Avr1 Proteína <i>r1</i></p> <p>Enfermedad Interacción compatible</p>
<i>avr1</i>	 <p>avr1 Proteína <i>R1</i></p> <p>Enfermedad Interacción compatible</p>	 <p>avr1 Proteína <i>r1</i></p> <p>Enfermedad Interacción compatible</p>

Figura 2. Modelo de Flor. Las interacciones incompatibles están controladas por la interacción entre el producto de un gen de resistencia de la planta (*R1*) y su correspondiente codificado por el patógeno (*Avr1*). Cuando la proteína *R1* interactúa específicamente con la proteína *Avr1* del patógeno se produce un reconocimiento específico, que desencadena una cascada de activación de los genes del hospedador que conduce a una inhibición del crecimiento del patógeno. Cuando el reconocimiento entre la proteína de resistencia y su respectivo ligando no ocurre, se está frente a una interacción de tipo compatible y se produce la enfermedad (Tomado de Buchanan, 2000).

Clasificación de los genes R

La clasificación de estos genes está basada en su secuencia aminoacídica y las distintas combinaciones de dominios estructurales, estos criterios han permitido clasificarlos en seis clases principales.

Clase 1

El gen *Pto* de tomate es el único miembro identificado, su producto posee un dominio catalítico serina treonina quinasa (STK) (Figura 4). Este gen confiere resistencia a *Pseudomonas syringae* pv. *Tomato*, cuando se expresa el gen de avirulencia correspondiente *avrPto* (Martin *et al.* 1993; Bogdanove 2002).

Clases 2 y 3

Estas dos clases de genes representan a la mayoría de los genes *R* y codifican proteínas con repeticiones ricas en leucinas (LRR) y un supuesto sitio de unión a nucleótido (NBS). Estas dos clases de proteínas difieren en su extremo N-terminal, mientras que las de clase 2 tienen una cremallera de leucina (LZ), las de clase 3 tienen un dominio conocido como

TIR, por su similitud con la proteína Toll de *Drosophila* y el Rceptor de la Interleukina-1 de mamíferos (Figura 4; Bent 1996; Hammond-Kosack & Jones 1997)

Los motivos LRR están asociados con las interacciones proteína-proteína y parecen ser clave para la función de la proteína R determinando su especificidad. Las leucinas conservadas (residuos L) en estas proteínas R ocupan un core hidrofóbico mientras que los otros residuos aminoacídicos (residuos x) forman una superficie expuesta hidrofílica, la cual puede participar en la unión a otras proteínas (Figura 3). Los estudios de comparación de secuencias demuestran que los residuos x, son hipervariables esto que sugiere que dicha superficie podría estar involucrada en reconocimiento de proteínas patogénicas (Buchanan, *et al.* 2000).

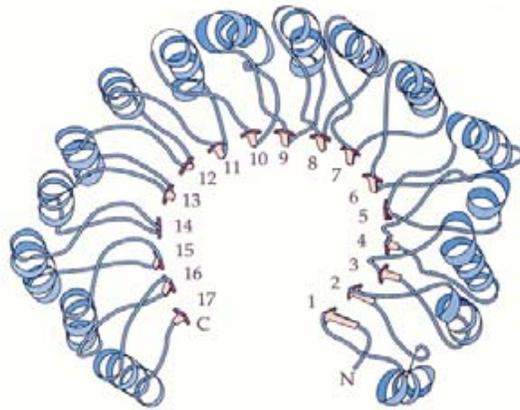


Figura 3. Estructura de un LRR. Las leucinas conservadas ocupan un core hidrofóbico (en rosa) y están numeradas de 1 a 17 mientras que los residuos aminoacídicos variables forman (en azul) una superficie expuesta hidrofílica, la cual puede participar en la unión a otras proteínas. (Tomado de Buchanan, 2000).

Los dominios NBS contienen varios motivos kinasa y también motivos hidrofóbicos. Aunque las proteínas R parecen no tener una actividad kinasa intrínseca pueden unirse a ATP o GTP y esto activa la respuesta de defensa (Buchanan, *et al.* 2000).

Los motivos LZ son conocidos por su rol en la dimerización de factores de transcripción en eucariotas, siendo también importantes en las interacciones con otras proteínas (Buchanan, *et al.* 2000).

El dominio TIR está presente en muchas proteínas R aparentemente tiene un rol en la señalización pero no participa en la unión al ligando (Buchanan, *et al.* 2000).

Ninguna de las proteínas codificadas por estas tres clases de genes R presentan asociación física con la membrana celular y todas son de localización citoplasmática.

Clase 4

Esta clase esta integrada por las glicoproteínas de tomate *Cf*, estas poseen un dominio NBS pero además tienen dominio transmembrana y un dominio extracelular LRR. Este grupo incluye las familias de genes *Cf-9*, *Cf-2*, *Cf-4* y *Cf-5* que confieren resistencia específica de cepa al patógeno *Clamidosporium fulvum* (Figura 4; Jones *et al.* 1994; Dixon *et al.* 1996).

Clase 5

Consiste en un solo representante, el gen de arroz *Xa21* que brinda resistencia a la bacteria *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. El producto de este gen contiene un dominio extracelular LRR, un dominio transmembrana y un dominio citoplasmático STK (Figura 4; Hulbert *et al.* 2001).

Clase 6

La ultima clase está representada por el gen *RRS1-R*, que confiere una resistencia recesiva de amplio espectro al patógeno *Ralstonia solanacearum* sin desarrollar HR. Este gen que contiene una señal de localización nuclear (NLS) y un dominio WRKY característico de factores de transcripción exclusivos de plantas en adición con los dominios TIR-NBS-LRR (Deslandes *et al.* 2002).

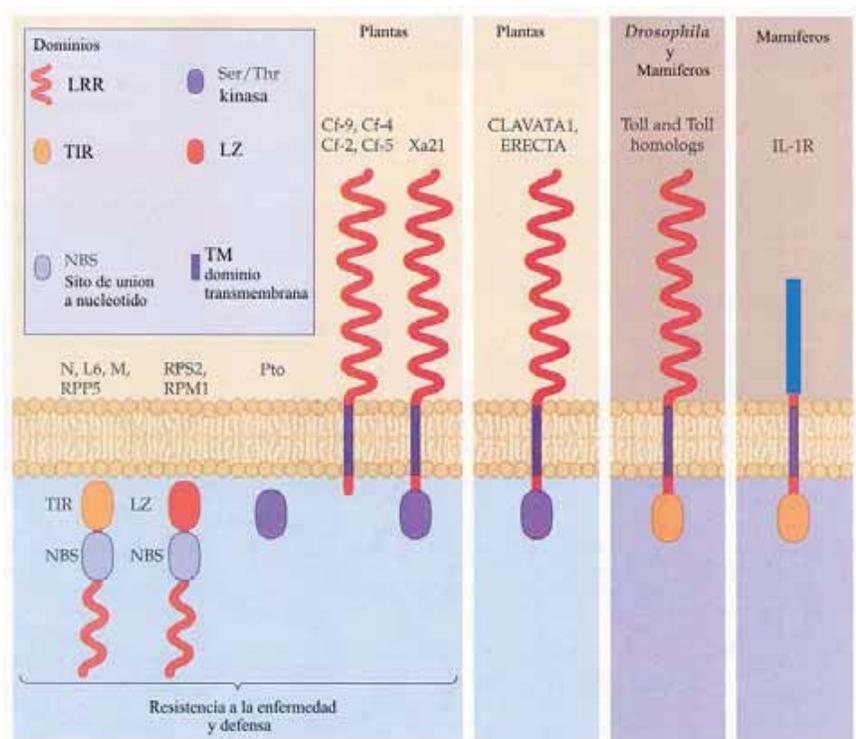


Figura 4. Representación esquemática de las distintas clases de proteínas R y los dominios que las componen. También se compara con proteínas estructuralmente relacionadas, involucradas en el desarrollo de la planta, como también otras proteínas que coordinan el desarrollo en *Drosophila* y la coordinación de la respuesta inmune en mamíferos. (Tomado de Buchanan, 2000).

Tipos de resistencia

El desarrollo de nuevas variedades de papa resistentes es un objetivo a cumplir en la mayoría de los programas de mejoramiento genético. A continuación se mencionan algunos de los principales tipos de resistencia, y se discuten las ventajas y desventajas del empleo de cada uno de ellos.

Resistencia Extrema (ER)

Las plantas inmunes no muestran síntomas ni lesiones necróticas al ser inoculadas. Solo puede detectarse en algunos casos, concentraciones extremadamente bajas del virus por técnicas de gran sensibilidad. Este tipo de resistencia está asociado a la presencia de genes dominantes de herencia monogénica (genes *R*). Cada uno de estos genes brinda a la planta inmunidad contra todas las cepas del virus (Solomon & Barker 2001^a).

Hipersensibilidad (HR)

El virus puede entrar en la célula y tener cierta multiplicación, pero muy tempranamente el tejido infectado muere, y la multiplicación se detiene (Galván 1991). La inducción de necrosis en el sitio de infección restringe el movimiento del virus limitando su crecimiento y expansión (Staskawicz *et al.* 1995). En otros casos la necrosis puede expandirse a través de la planta causándole la muerte, este tipo de respuesta limita la expansión del virus hacia otras plantas del cultivo, pero puede también conducir a una pérdida total del mismo (Celebi-Toprak *et al.* 2002). En ocasiones la HR puede ser activada pero el mecanismo que restringe el movimiento del virus en los tejidos de la planta falla provocando grandes lesiones necróticas, en las venas o en las hojas inoculadas y también en otras partes de la planta siguiendo el movimiento sistémico del virus. Las altas temperaturas pueden modular la expresión de la HR, reduciendo la eficiencia de los mecanismos que restringen el movimiento viral causando la expansión de los síntomas necróticos en los tejidos (Vidal *et al.* 2002).

La respuesta de hipersensibilidad es controlada por pocos genes dominantes (genes *N*) y cada gen es eficaz contra algunas cepas del virus, y además puede también ser afectado por condiciones ambientales o la fisiología de la planta (Solomon & Barker 2001^a; Vidal *et al.* 2002).

Se ha sugerido una conexión entre ER y HR, dado que algunas veces ocurre necrosis en plantas con genes *R*, también se ha encontrado evidencia de que los genes *R* pueden ser

dominantes o epistáticos sobre los genes *N* (Valkonen *et al.* 1994, citado por Solomon Barker 2001^a).

Tolerancia

Las plantas infectadas son asintomáticas o presentan una expresión reducida de los síntomas en presencia de la enfermedad. La tolerancia no es un sinónimo de resistencia, pero hace algún tiempo estos términos se usaban de forma intercambiable generando confusión. Las plantas tolerantes son susceptibles a la infección con el virus el cual se multiplica extensivamente en el hospedador aunque no manifiesta los síntomas de la enfermedad (Solomon & Barker 2001^b).

Ventajas del empleo ER y HR en el mejoramiento

El énfasis puesto en el empleo de ER y HR en los programas de mejoramiento frente a PVY, radica en que el carácter dominante junto con el tipo de herencia monogénico de los genes *Ry* y *Ny*, simplifican el proceso de selección, a diferencia de otros tipos de resistencia como la derivada de *S. phureja* de tipo poligénica que tiende a disiparse con los cruzamientos sucesivos dificultando la obtención de genotipos resistentes. (Solomon & Barker 2001^{a,b}). También resultan claras las ventajas de seleccionar genes *Ry* sobre genes *Ny* ya que los primeros confieren protección efectiva contra todas las cepas de PVY.

La resistencia es obviamente preferible a la tolerancia, pero cuando la posibilidad de cultivos resistentes está limitada, un cultivo tolerante puede ser preferible por razones diferentes a la resistencia al virus (por ej: rendimiento, calidad, madurez o resistencia a otras enfermedades). Sin embargo, la selección de líneas tolerantes puede ser peligrosa por el riesgo de que el virus se expanda desde el material infectado asintomático al material cultivado sano ubicado en la proximidad, (Solomon & Barker 2001^b).

Nomenclatura de los genes de resistencia en papa

La nomenclatura de estos genes esta ligada al tipo de resistencia involucrado. La letra inicial se denota con mayúscula, siendo una *N* si se trata de HR y una *R* si es ER. A continuación se indica con letra minúscula el virus o la cepa frente a la cual se da la resistencia y finalmente en subíndice minúscula abreviado la especie en la cual se encontró o es originaria la resistencia (Valkonen *et al.* 1996; Solomon & Barker 2001^b).

Genes Ry

Las especies silvestres de papa son fuentes de resistencia contra diversos patógenos, y en el caso de PVY se han reportado diversas fuentes de resistencia. En la Tabla 1 se mencionan algunas de las fuentes principales, junto con diez genes de resistencia de herencia simple dominante. Cuatro de estos son genes *Ny* que brindan resistencia de tipo HR, los otros seis son genes *Ry* que confieren ER contra todas las cepas de PVY. Dos de estos seis han sido mapeados en la misma región en el cromosoma XI, el gen *Ry_{adg}* derivado de *S. tuberosum subesp andígena* y *Ry_{sto}* proveniente de *S. stoloniferum*, estos son los mas empleados en los programas de mejoramiento genético frente a PVY. Los genes *Ry_{phu}* de *S. phureja* y *Ry_{bre}* de *S. brevidens* pueden estar en un loci cromosómico distinto (Hämäläinen *et al.* 1997). El gen *Ry_{hou}* deriva de la especie *S. hougasii* y no se han reportado marcadores para dicho gen hasta la fecha. Un sexto gen de ER a PVY fue recientemente mapeado en un nuevo locus en el cromosoma XII de *S. stoloniferum*, se ha denominado *Ry-f_{sto}* y está incorporado en las poblaciones de mejoramiento de países como Polonia Alemania y Holanda. Para su monitoreo se ha desarrollado el marcador CAPS GP122₇₁₈ que cosegrega con *Ry-f_{sto}* y dista de dicho locus 1,2 cM (Flis *et al* 2004, aún sin publicar).

Tabla 1. Genes de resistencia a PVY			
Tipo de Resistencia	Gen	Especie	Referencia
ER	<i>Ry_{sto}</i>	<i>S. stoloniferum</i>	Ross (1961); Cockerham (1970); Barker (1997)
ER	<i>Ry-f_{sto}</i>	<i>S. stoloniferum</i>	Flis et al. (2004)
ER	<i>Ry_{adg}</i>	<i>S.t. ssp. andigena</i>	Muñoz et al. (1975); Valkonen et al. (1994)
HR	<i>Ny_{adg}</i>	<i>S.t. ssp. andigena</i>	Valkonen et al. (1994)
HR	<i>Ny_{dms}</i>	<i>S. demissum</i>	Cockerham (1970) (1958)
ER	<i>Ry_{hou}</i>	<i>S. hougasii</i>	Cockerham (1970)
ER	<i>Ry_{phu}</i>	<i>S. phureja</i>	Hämäläinen et al. (1997)
ER	<i>Ry_{bre}</i>	<i>S. brevidens</i>	Hämäläinen et al. (1997)
HR	<i>Ny_{chc}</i>	<i>S. chacoense</i>	Cockerham (1970)
HR	<i>Ny_{tbr}</i>	<i>S. tuberosum</i>	Hutton (1951); Davidson (1980); Jones (1990)

Datos tomados de Solomon & Barker 2001¹, Hämäläinen et al. 1997 y Flis et al 2004.

Detección de *Ry_{adg}*

Leister *et al.* (1996) diseñó cebadores para dos regiones consenso, presentes en el gen *N* de clase 3, de resistencia al virus de mosaico del tabaco (TMV) derivado de *Nicotiana glutinosa* y el gen de clase 2, *RPS2* de resistencia a *Pseudomonas syringae* derivado de *Arabidopsis thaliana*. Estos cebadores fueron empleados para amplificar por PCR en papa RGLs (“Resistance Gene Like” o genes tipo resistencia). El cebador 5’ reconoce una

11 diferencias nucleotídicas entre ADG2 del clon resistente 2x(V-2)7 y el susceptible 84.194.30 (Tabla 2, Kasai *et al.* 2000; Sorri *et al.* 1999). La mutación en la posición N° 260 del ADG2 es una mutación G→C localizada dentro de un motivo kinasa-3a (Figura 5) que resulta en una sustitución aminoacídica Ser→Thr, mientras que las restantes son mutaciones silenciosas (Sorri *et al.* 1999).

Tabla 2. Diferencias nucleotídicas dentro de los ADG2 homologos derivados del genotipo resistente 2x(V-2)7 y el susceptible 84.194.30

Posición N°	Nucleotido	
	2x(V-2)7	84.194.30
38	C	T
141	G	T
177	A	G
181	C	T
190	C	G
220	A	G
222	A	T
260 ^a	C	G
297 ^b	T	A
312 ^b	C	T
321 ^b	T	C

^a mutación que resulta en una sustitución aminoacídica.
^b mutaciones silenciosas

El marcador SCAR RYSC3 utiliza para la identificación de ADG2 los cebadores 333s y ADG23R (Tabla 4). El cebador 333s se une desde la base 1 a 23 del ADG2, región en la cual no hay diferencias entre resistentes y susceptibles; el cebador ADG23R reconoce desde la posición 297 a 321 tres mutaciones silenciosas en las posiciones 297, 312, y 321 (Tabla 2; Figura 6), estas diferencias permiten ajustar la reacción de PCR de forma que ADG23R se una solo a aquellas muestras portadoras del alelo ADG2 asociado a *Ry_{adg}*, produciéndose la amplificación solo en aquellos genotipos que son resistentes. Este marcador identifica exclusivamente y con muy alta eficiencia los genotipos portadores de *Ry_{adg}*, lo que ha llevado a plantear la hipótesis de que ADG2 puede estar integrando el propio *Ry_{adg}* (Kasai *et al.* 2000; Sorri *et al.* 1999). El gen del cual ADG2 forma parte fue clonado, aislado y caracterizado de plantas de la línea 2x(v-2)7, este es un gen de clase 3 y se denominó como *Y-1*. Las plantas transformadas con este gen expresaron síntomas de muerte celular bajo la infección con PVY, pero el movimiento del virus no fue restringido (Vidal *et al.* 2002). Los análisis genéticos indican un alto grado de ligamiento entre ADG2 y *Ry_{adg}* (Kasai *et al.* 2000; Sorri *et al.* 1999). La información disponible actualmente no permite excluir la posibilidad de que *Y-1* y *Ry_{adg}* sean el mismo gen.

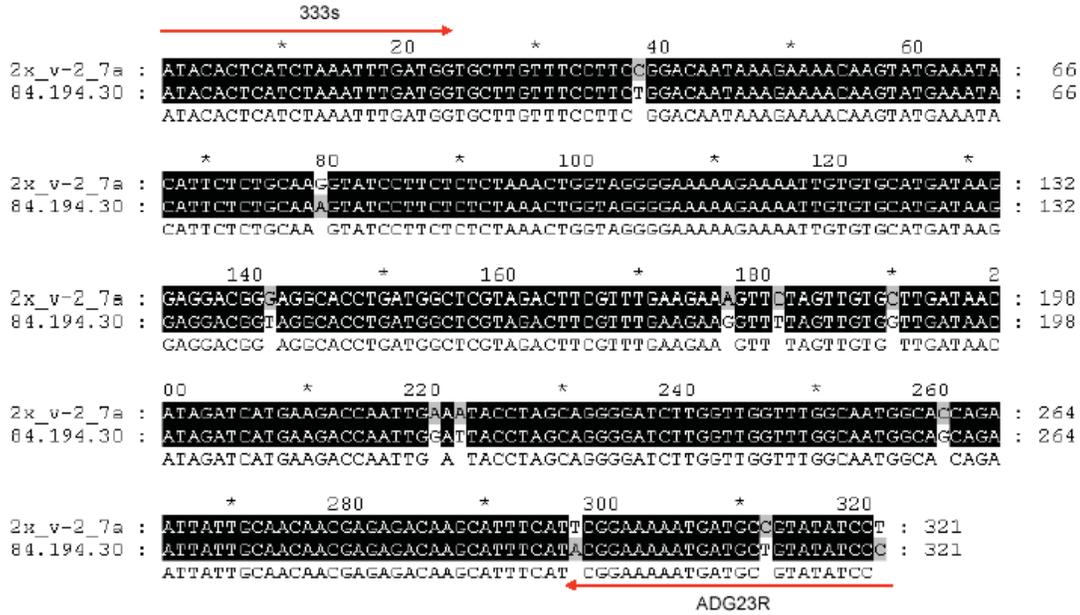


Figura 6. Comparación de las secuencias nucleotídicas de los ADG2 homologos derivados del genotipo resistente 2x(V-2)7 y el susceptible 84.194.30. El cebador 333s se une desde la base 1 a 23 del ADG2 región en la cual no hay diferencias entre resistentes y susceptibles; el antisentido ADG23R reconoce desde la posición 297 a 321 tres mutaciones silenciosas en las posiciones 297, 312, y 321, estas diferencias permiten ajustar la reacción de PCR de forma que ADG23R se una solo aquellas muestras portadoras del alelo ADG2 asociado a Ry_{adg} , produciéndose la PCR solo en aquellos genotipos que son resistentes

Detección de Ry_{sto}

El gen fue Ry_{sto} mapeado por Brigneti *et al.* (1997) mediante marcadores AFLP (“Amplified Fragment Length Polimorphism” o polimorfismo de longitud de los fragmentos amplificados). La ubicación cromosómica de Ry_{sto} fue determinada por análisis de la segregación de la F1 de una población de papas tetraploides, identificando tres marcadores AFLP a cada lado de Ry_{sto} . Uno de estos marcadores denominado M39b fue mapeado en la F2 de una población de tomates (*Lycopersicon*), demostrando lo anticipado por los estudios de la sintenia (Bonierbale *et al.* 1988; Gebhardt *et al.* 1991; Tanksley *et al.* 1992), que indican que los marcadores ligados a Ry_{sto} ocupan posiciones homólogas en los genomas de papa y tomate. Este análisis indicó que M39b se localiza en el grupo de ligamiento XI en tomate bordeado por los marcadores de RFLP GP163 y GP269 que han sido mapeados previamente en el genoma de papa (Gebhardt *et al.* 1991) confirmando así la presencia de Ry_{sto} en el cromosoma XI.

Posteriormente se pasó a la construcción de un mapa de alta resolución de los marcadores relativos a Ry_{sto} con lo que se obtuvieron cinco nuevos marcadores estrechamente ligados al locus de Ry_{sto} (M33, M17, M5, M45, M6) dos de los cuales flanquean dicho locus, el M45 situado a 0,16 cM y M6 a 0,083 cM (Figura 7; Gishlain com pers).

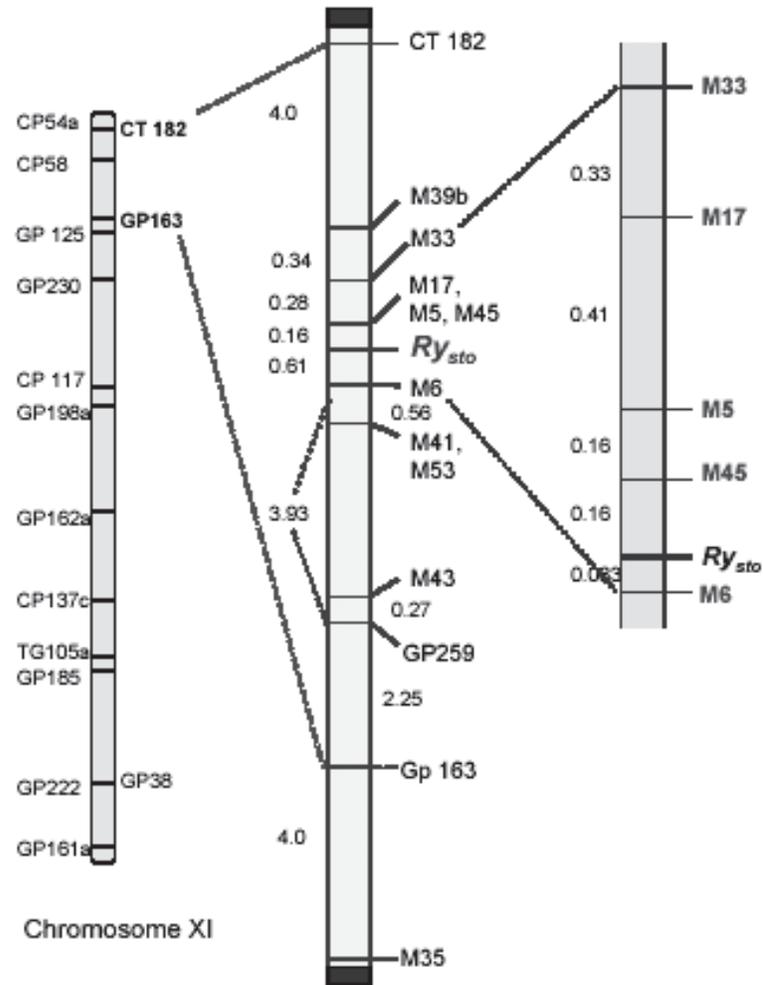


Figura 7. mapa de alta resolución del cromosoma XI con los marcadores relativos a *Ry_{sto}* dos de estos flanquean dicho locus, el M45 dista 0,16 cM y M6 a 0,083 cM.

OBJETIVO

Los gravedad de los daños causados a la producción nacional por PVY, han llevado al programa de mejoramiento genético de INIA a desarrollar genotipos resistentes a la enfermedad los cuales ya han sido testados en ensayos de campo mostrando diferentes grados de resistencia.

En este trabajo se analizaron 46 de estos materiales, con el fin de confirmar mediante marcadores moleculares lo observado en los ensayos de campo. Se emplearon marcadores para estudiar la presencia de materiales con resistencia extrema al virus Y, derivada de los genes *Ry_{adg}* y *Ry_{sto}*, utilizándose el marcador SCAR RYSC3 para la detección de *Ry_{adg}* (Kasai *et al.* 2000) y el marcador M45 para *Ry_{sto}* (Brigneti *et al* 1997).

MATERIALES Y MÉTODOS

Genotipos empleados

Para el presente trabajo se seleccionaron 46 genotipos con distintos grados de respuesta a PVY, 21 de estos son variedades comerciales de diversos orígenes dentro de las cuales se incluyó la variedad INIA Iporá desarrollada localmente y los 25 restantes constituidos por clones desarrollados en el programa de mejoramiento. En general estos materiales mostraron distinto grado de resistencia a PVY en ensayos de campo (Tabla 3), la variedad Iporá no muestra síntomas de la enfermedad al igual que muchos de los clones que se van a testar. Para siete de las variedades comerciales se conoce su condición con respecto al virus, cuatro de estos siete fueron testados por Kasai et al (2000) siendo tres de ellos negativos (Serrana, Chieftain y Atlantic) y uno positivo (NY121) para el marcador RYSC3, los otros tres (Dakota rose, Redsen, Norvaley) son cultivares susceptibles (Vilaró com pers).

Del total de muestras analizadas 42 fueron recolectadas de invernáculo y cinco de cultivo in vitro (Tabla 3). Se incluyeron dos muestras adicionales, una de un clon diploide de la línea resistente 2x(V-2)7 derivado de *S. tuberosum ssp. andígena* (Hämäläinen et al. 1998; Sorri et al. 1999; Kasai, et al. 2000) como control positivo y otra de un clon de la línea susceptible v2:134 obtenida de un cruzamiento entre 2x(V-2)7 y 84.194.30 (Vidal et al. 2002) como control negativo.

Extracción de ADN

Se pesaron 10 mg de muestra procedente de brotes u hojas pequeñas en un tubo eppendorf de 2 ml, luego se maceró con un embolo de teflón por unos pocos segundos en presencia de nitrógeno líquido, se agregaron 400 µl de buffer de extracción (200 mM Tris-HCl pH 7.5, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0.5% SDS) y se continuó macerando hasta obtener un extracto homogéneo. A continuación se centrifugó a 14000 rpm 10 min, después se transfirieron 300 µl del sobrenadante a un tubo eppendorf de 1.5 ml, se mezcló con isopropanol, se invirtieron los tubos hasta mezclar las fases y se centrifugó a 14000 rpm 15 min. El pellet se dejó secar una hora a temperatura ambiente luego se disolvió en 150 µl de TE y se centrifugó a 14000 rpm 2 min; finalmente se transfirieron 130 µl del sobrenadante a un nuevo tubo eppendorf de 1.5 ml (Edwards et al. 1991; Dalla Rizza et al. 2004).

Una vez culminada la etapa de extracción se estimó por espectrofotómetro el rendimiento obtenido (Tabla 3), midiendo 100 µl de una dilución 1/25 de las soluciones madres, tomando en cuenta que 1 OD corresponde a aproximadamente 50µg/ml de ADN doble cadena, 40µg/ml de ARN o ADN monohebra (Sambrook, *et al.* 1989). Posteriormente se realizó una electroforesis en gel de agarosa 0.9% para verificar el estado físico del ADN y estimar mediante tinción con bromuro de etidio la cantidad de ADN obtenido, la masa total de ADN es proporcional a la intensidad de la fluorescencia (Sambrook, *et al.* 1989). En todos los casos las extracciones fueron realizadas por duplicado y para los análisis moleculares se escogieron aquellas muestras que tuvieron mejores resultados en la electroforesis en agarosa y en espectrofotómetro. Con los datos recavados se prepararon soluciones de trabajo de aproximadamente 50 ng/µl.

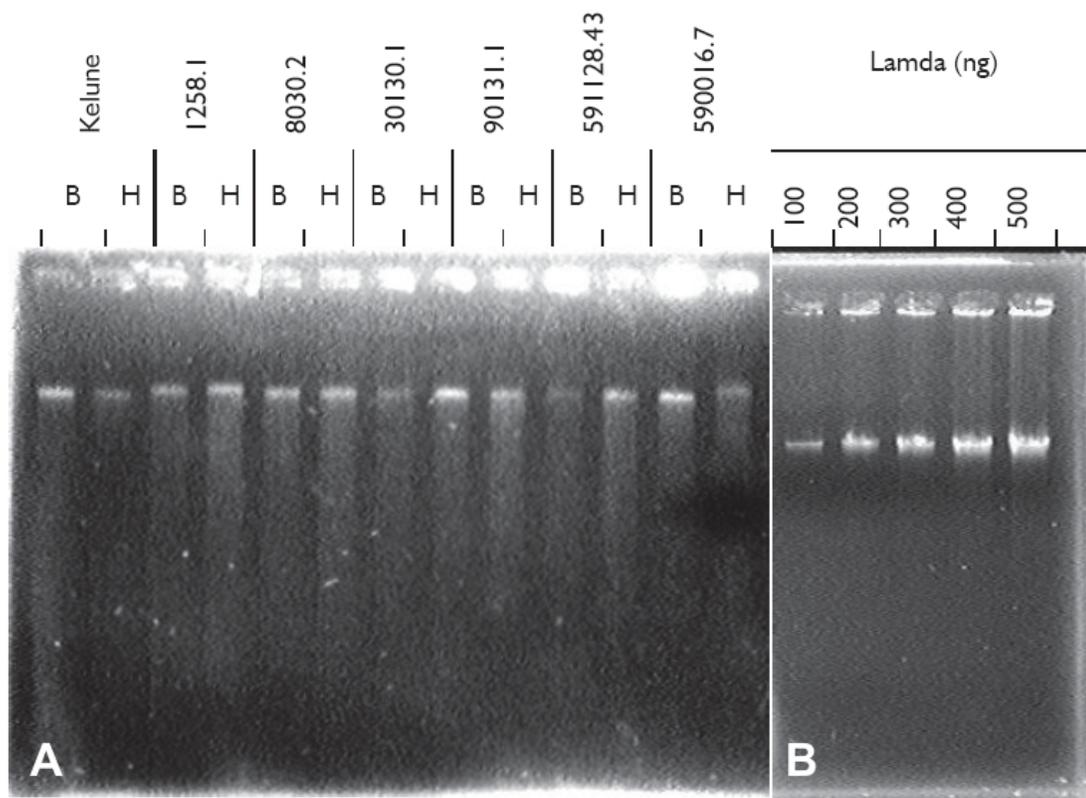


Figura 8. Agarosa 0.9%. A ADN genómico de seis genotipos extraídos por duplicado, en cada caso se sembraron 2µl de solución madre, se dejó migrar 30min a 100V (B, extracción realizada de Brotes; H, a partir de Hoja). B Electroforesis de ADN lamda en las cantidades indicadas en la figura.

Tabla 3. Lista de genotipos analizados, y cuantificación por espectrofotómetro							
	Nº de Muestras	Genotipos	Fenotipos a campo	Absorbancia			Rendimiento ng/µl de ADN
				260	280	260/280	
Clones	1	1258,1	s	0,1090	0,057	1,9123	136,25
	2	30131,1	r	0,1494	0,0777	1,9228	186,75
	3	38009,2	r	0,1835	0,0946	1,9397	229,375
	4	382284,16	s	0,3212	0,1768	1,8167	401,5
	5	387600,1	r	0,3656	0,1859	1,9666	457
	6	387664,1	r	0,4304	0,2200	1,9564	538
	7	394034,65	r	0,1805	0,0922	1,9577	225,625
	8	590016,7	r	0,1446	0,0765	1,8902	180,75
	9	591128,43	s	0,2225	0,1128	1,9725	278,125
	10	793101,2	r	0,2446	0,1292	1,8932	305,75
	11	8800,1	r	0,1048	0,0512	2,0469	262
	12	8830,2	r	0,2339	0,1218	1,9204	292,375
	13	90130,1	r	0,2514	0,1302	1,9309	314,25
	14	90147,2	r	0,3396	0,1907	1,7808	424,5
	15	91119,1 ^a	r	0,0471	0,0249	1,8916	58,875
	16	92324,1	r	0,4865	0,2559	1,9011	608,125
	17	93057,1	s	0,2724	0,1347	2,0223	340,5
	18	93060,4 ^a	r	0,0538	0,0293	1,8362	67,25
	19	94138,1	r	0,1320	0,0765	1,7255	165
	20	95029,6 ^a	r	0,0452	0,0237	1,9072	56,5
	21	95043,11	r	0,0934	0,0461	2,0260	116,75
	22	95091,4	r	0,0869	0,0440	1,9750	108,625
	23	97141,2 ^a	r	0,0476	0,0263	1,8099	59,5
	24	97145,4	r	0,1846	0,0956	1,9310	230,75
	25	B92870,1	s	0,2587	0,1326	1,9510	323,375
Variedades	26	Achirana	t	0,2083	0,1175	1,7728	260,375
	27	Astrid	s	0,1141	0,0605	1,8860	142,625
	28	Atlántic	S	0,2061	0,1095	1,8822	257,625
	29	Chieftain	S	0,3257	0,1622	2,0080	407,125
	30	Commersonii ^{w.s}	n.d	0,0320	0,0177	1,8079	40
	31	Cyclamen	t	0,1038	0,0527	1,9696	129,75
	32	Dakota Rose	S	0,0991	0,0541	1,8318	123,875
	33	Flavia	s	0,0642	0,0321	2,0000	80,25
	34	Iporá	r	0,2361	0,1288	1,8331	295,125
	35	Iris	s	0,1224	0,0630	1,9429	153
	36	Jazmín	s	0,1052	0,0586	1,7952	131,5
	37	Kelune	s	0,0981	0,0513	1,9123	122,625
	38	Kenebec	S	0,1312	0,0667	1,9670	164
	39	Norvalley	R	0,2133	0,1104	1,9321	266,625
	40	NY121	R	0,1510	0,0793	1,9042	188,75
	41	Pucará	s	0,2575	0,1299	1,9823	321,875
	42	Redsen	s	0,1567	0,0791	1,9810	195,875
	43	Roxy	t	0,063	0,0329	1,9149	78,75
	44	Serrana ^a	H	0,0441	0,0229	1,9258	55,125
	45	W.Lady	t	0,1421	0,0710	2,0014	177,625
	46	Yagana ^a	S	0,0488	0,0281	1,7367	61

Ensayos de campo: r genotipos resistentes en, s genotipos que desarrollaron síntomas a campo, t materiales que mostraron un cierto grado de resistencia.
 En mayúsculas materiales cuya condición frente al virus es conocida por datos bibliográficos (R, resistencia extrema; S, susceptible; y H hipersensible)
^a muestras tomadas de material de cultivo in vitro, se observan rendimientos mas bajos con que los obtenidos con plantas de invernáculo.
^{w.s} Especie Silvestre

Condiciones de PCR

Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un termociclador Genius Techne, y en todos los casos los reactivos de PCR empleados fueron ATGen, Montevideo, Uruguay.

Marcador RYSC3, Ajuste de reacción

La discriminación entre materiales resistentes y susceptibles por parte del marcador RYSC3 se basa en la identificación de tres mutaciones silenciosas en las posiciones 297, 312, y 321 (Figura 6). Estas diferencias permiten ajustar la reacción de PCR de forma que el cebador antisentido ADG23R se una solo aquellas muestras portadoras del alelo ADG2 asociado a *Ry_{adg}*, produciéndose la PCR solo en aquellos genotipos que son resistentes. Por esta razón se debió ajustar la reacción cuidadosamente a fin de evitar amplificaciones inespecíficas. Con este objetivo y empleando en el ciclador previamente citado, se seleccionaron para ajustar la reacción seis genotipos cuya condición frente al virus era conocida (Chieftain, Atlantic, NY121, Dakota rose, Redsen, Norvaley) sumados a los controles 2x(V-2)7 y v2:134, también se incluyeron once muestras testadas a campo.

En una primera instancia la reacción se llevó a cabo en una temperatura de hibridación (T_a) de 55°C y 0.8 mM de dNTPs y en estas condiciones amplificaron los genotipos susceptibles, Atlantic, Dakota rose y Norvalley el control negativo v2:134, además se observan amplicones inespecíficos de diversos pesos moleculares en varios carriles.

Con el fin de lograr una mayor especificidad T_a se incrementó a 60°C, en estas condiciones no se observaron amplicones inespecíficos; sin embargo la banda esperada de 321pb apareció en distintas intensidades, siendo débil o nula en los controles susceptibles y más fuerte en los genotipos NY121 y 2x(V-2)7; en estas condiciones la señal más intensa se observó en cuatro materiales clasificados como resistentes en los ensayos de campo (Iporá, 793101.2, 8800.1 y 95043.11).

Finalmente se disminuyó la concentración de dNTPs a 0.1mM para aumentar la especificidad de la reacción (Newton & Graham, 1994) manteniendo T_a en 60°C; en estas condiciones desaparecieron definitivamente las bandas inespecíficas, observándose claramente presencia o ausencia de bandas en los pesos esperados, que se correlacionaron coherentemente con todos los controles empleados (Figura 9). Durante el ajuste solo se variaron las concentraciones de dNTPs y T_a , el resto parámetros permanecieron incambiados, las condiciones finales de reacción se describen a continuación.

El ciclado con RYSC3 fue de 93°C por 9 min, seguidos de 35 ciclos de desnaturalización a 94°C por 45 seg, con $T_a = 60^\circ\text{C}$ y extensión a 72°C por 60 seg, seguidos de una extensión final a 72°C por 5 min, en un termociclador Genius Techne. El volumen de reacción empleado fue de 20 μl conteniendo buffer de PCR 1X, 0.1 mM de dNTPs, 1.5 mM MgCl, 0.25 μM de cada cebador 333s y ADG23R (ver tabla 4), 2 U de *Taq* ADN polimerasa y 50 ng de ADN.

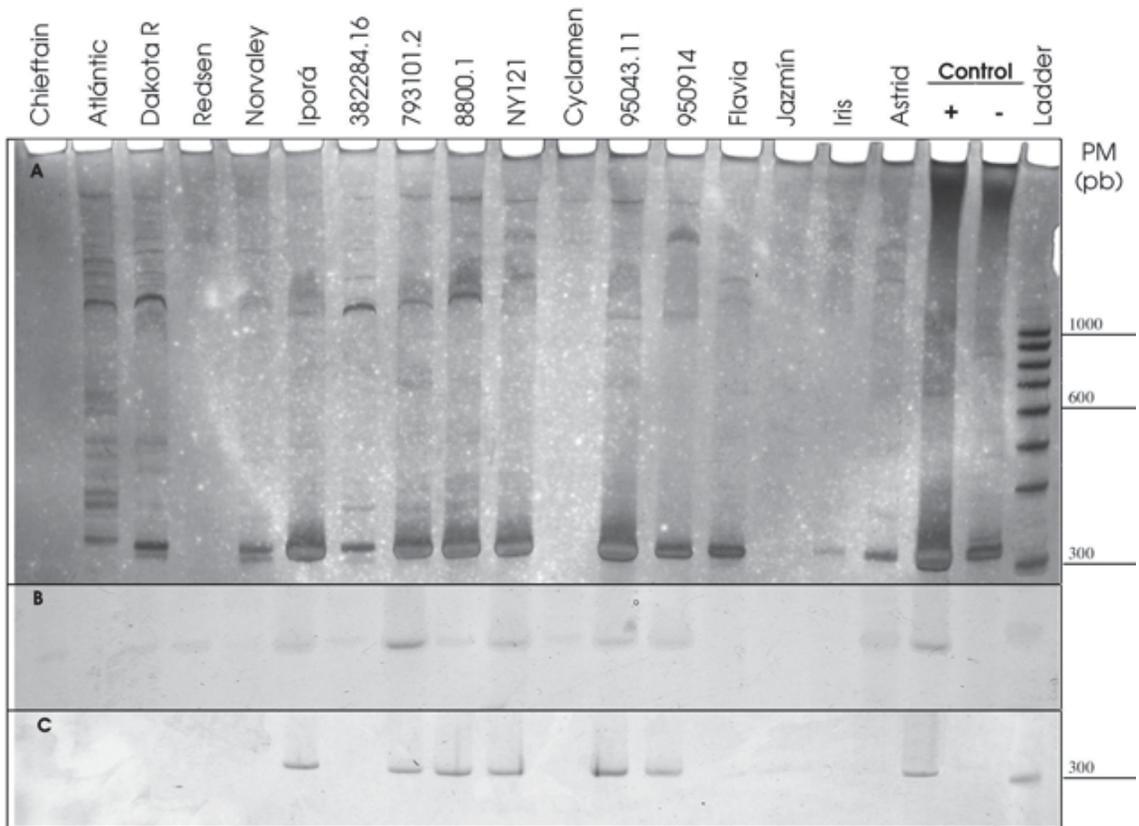


Figura 9. A reacción que se llevó a cabo en $T_a = 55^\circ\text{C}$ y 0.8 mM de dNTPs, en estas condiciones se amplificaron los genotipos susceptibles, Atlantic, Dakota rose y Norvalley también se amplificó el control negativo v2:134, además se observan amplicones de diversos pesos moleculares en varios carriles. B T_a fue incrementada a 60°C , en estas condiciones no se observaron amplicones de pesos moleculares variados, sin embargo la banda esperada de 321pb aparece en distintas intensidades. C Se disminuyó la concentración de dNTPs a 0.1mM para aumentar la especificidad de la PCR (Newton & Graham, 1994) manteniendo T_a en 60°C , en estas condiciones desaparecieron los medios tonos, observándose claramente presencia o ausencia de bandas, que se correlacionan coherentemente con todos los controles empleados por lo que se consideró ajustada la reacción.

Marcador M45

Las condiciones de reacción para M45 fueron de 94°C por 60 seg, seguidos de 30 ciclos de desnaturalización a 94°C por 20 seg, con una temperatura de hibridación 61°C por 20 seg y extensión a 72°C por 20 seg, seguidos de una extensión final a 72°C durante 20 min en un termociclador Genius Techne. La amplificación se llevó a cabo en un volumen de reacción de 25 μl conteniendo buffer de PCR 1X, 0.4 mM de dNTPs, 1.2 mM MgCl, 0.25

μ M de cada cebador M45-m y M45-p (ver tabla 4), 2 U de *Taq* ADN polimerasa y 250 ng de ADN, se utilizaron tubos de PCR de 0.5 ml.

Tabla 4.
Secuencias de los cebadores de los marcadores RYC3 y M45

Marcador	Cebador	Secuencia	Long del Cebador
RYC3	333s	5´ - ATA CAC TCA TCT AAA TTT GAT GG - 3´	23
	ADG23R	5´ - AGG ATA TAC GGC ATC ATT TTT CG A - 3´	25
M45	m-45 m	5´ - CCT AGT TTC GCA TGT AAT TTC - 3´	24
	m-45 p	5´ - TGC AGC TAT TCA AAA CAC ATA AGG - 3´	24

Electroforesis

Los productos amplificados fueron separados por electroforesis no desnaturizante en poliacrilamida usando un equipo vertical de 1,5 mm de separación (Hoeffer Sturdier, SE400 Amersham Pharmacia S. Francisco Cal USA). Se emplearon geles de poliacrilamida 8% (w/v), buffer TBE 1 \times (Sambrook *et al.* 1989), glicerol 2% (w/v). Se agregaron 100 μ l persulfato de amonio 10%, y 40 μ l TEMED en un volumen final de 40ml. Inmediatamente antes de la incorporación de persulfato de amonio y TEMED la solución fue desgasificada utilizando una bomba de vacío. Finalmente la solución de gel fue vertida en la cubeta empleando una jeringa. La solución se dejó polimerizar a temperatura ambiente durante aproximadamente 40 min.

A los productos del PCR se les agregó 4 μ l de buffer loading dye 6 \times , luego se procedió a sembrar las muestras con una jeringa Hamilton y se dejó migrar a 200V y corriente libre.

El resultado de la electroforesis fue revelado mediante tinción con nitrato de plata. El gel se fijó 20min en ácido acético 10%. Posteriormente se llevaron a cabo dos lavados consecutivos de 4min cada uno, con agua ultrapura la cual fue retirada para después agregar 300ml de solución de tinción (0,3g nitrato de plata, 0,450ml formaldehído 37% (w/v)), se dejó agitando 30min al cabo de los cuales fue descartada y el gel sometido a un enjuague rápido (10seg aprox) con agua ultrapura luego se agregaron 300ml de la solución de revelado (9gr carbonato de sodio, 0,450ml formaldehído 37% (w/v), 6 μ l tiosulfato de sodio (100mg/ml)), se dejó agitar hasta la aparición de bandas, y se agregó ácido acético 10% para detener la reacción.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De los 46 genotipos testados el marcador SCAR RYSC3 amplificó el fragmento ADG2 esperado de 321pb en 19 de ellos. Por su parte el marcador M45 identificó como resistentes estos mismos genotipos, incorporando además el clon 94138,1 a la lista de materiales inmunes (Figura 10), también detectó como resistente al parental 2x(V-2)7 derivado de *S. tuberosum ssp. andígena* (Figura 11). Resulta destacable el alto porcentaje de genotipos locales resistentes, así como también la gran concordancia existente entre los resultados moleculares y los ensayos de campo (Tabla 5), evidenciando el interés prestado en el programa en incorporar este tipo de resistencia en el desarrollo de sus variedades, ya que el mismo confiere una protección efectiva contra todas las cepas de PVY.

El clon 94138,1 fue el único genotipo que se reveló positivo para M45 y negativo para RYSC3 (Figuras 10 y 11; Tabla 3) por lo que se le atribuyó una resistencia mediada por *Rysto* y no por *Ryadg*. La ascendencia de 94138,1 fue rastreada para verificar la presencia de materiales resistentes derivados de *S. stoloniferum* en su genealogía para lo cual se solicitó apoyo al CIP (Centro Internacional de la Papa). Dicho genotipo es producto de un cruzamiento entre INIA-591127.45 x NDD, los padres del 591127.45 son 86.6045 x V3H30, siendo V3H30 un haploide del clon 378650.1. En ascendencia del parental 591127.45 existen genotipos con ER a PVY (Figura 12) descendientes *S. stoloniferum* lo que es congruente con los resultados obtenidos.

Aquellos genotipos que resultaron positivos para ambos marcadores se consideraron dotados de una resistencia derivada de *S. tuberosum ssp. andígena*, dado que RYSC3 identifica con un alto grado de confiabilidad el ligamiento entre ADG2 y *Ryadg*, además no identifica la resistencia derivada de otras especies (Kasai *et al.* 2000).

La capacidad de M45 para identificar simultáneamente las dos fuentes principales de resistencia en los genotipos empleados en este estudio fue un resultado inesperado, revelando incluso como positivo al genotipo 2x(V-2)7 de *S. tuberosum ssp. andígena* (Figura 11). El alto grado de coincidencia que presenta con respecto a los resultados obtenidos para RYSC3, demuestra que el marcador M45 resulta eficiente para testar la presencia de *Ryadg* y no solamente la de *Rysto*, para el cual fue diseñado y reportado. La capacidad de identificar ambas fuentes de inmunidad, lo destaca como una herramienta eficiente y práctica para la selección de progenitores inmunes al virus Y, a diferencia de otras metodologías no requiere de endonucleasas de restricción lo que permite reducir los costos y el tiempo de estudio.

Esta característica de segregar con Ry_{sto} y Ry_{adg} es compartida con los marcadores RFLPs, TG508 y GP125 reportados por Hämäläinen *et al.* 1997, estos fueron desarrollados en el mapeo y detección de Ry_{adg} . El marcador TG508 dista del locus Ry_{adg} 2cM (máxima distancia estimada) este marcador muestra también una señal positiva en las líneas de mejoramiento 86.61.26 y 2x(V-3)30 ambas portadoras de Ry_{sto} , el marcador GP125 identifica también la presencia de Ry_{sto} en la línea 2x(V-3)30. Ninguno de estos dos marcadores detectaron la ER derivada de *S. phureja* y *S. brevidens* (Hämäläinen *et al.* 1997). Aun resta saber como se comporta el marcador M45 en genotipos de genealogías conocidas dotados de otras fuentes de ER a PVY. Estos resultados sugieren que la región del cromosoma XI de los genotipos resistentes de *S. ssp andígena* y *S. stoloniferum* son mas similares entre sí, que con genotipos susceptibles o portadores de otras fuentes de resistencia, el alto grado de ligamiento de estos marcadores con los genes Ry_{sto} y Ry_{adg} , permite plantear la hipótesis de que tal vez Ry_{sto} y Ry_{adg} no sean genes distintos y que tal vez puedan tener un origen común pudiendo ser dos variantes alélicas de un mismo gen. En la medida de que surjan nuevos marcadores que flanqueen cada vez mas estrechamente estos genes, se podrá clonarlos, secuenciarlos y compararlos resolviendo finalmente esta controversia.

Tabla 5.

Correlación entre los marcadores moleculares empleados y los ensayos de campo.

	Nº de Muestras	Genotipos	Fenotipos a campo	Marcadores	
				RYSC3	M45
Clones	1	1258,1	s	-	-
	2	30131,1	r	+	+
	3	38009,2	r	+	+
	4	382284,16	s	-	-
	5	387600,1	r	+	+
	6	387664,1	r	+	+
	7	394034,65	r	-	-
	8	590016,7	r	+	+
	9	591128,43	s	-	-
	10	793101.2	r	+	+
	11	8800.1	r	+	+
	12	8830,2	r	-	-
	13	90130,1	r	+	+
	14	90147,2	r	+	+
	15	91119,1 ^a	r	+	+
	16	92324,1	r	+	+
	17	93057.1	s	-	-
	18	93060,4 ^a	r	+	+
	19	94138,1	r	-	+
	20	95029,6 ^a	r	+	+
	21	95043.11	r	+	+
	22	95091.4	r	+	+
	23	97141,2 ^a	r	+	+
	24	97145,4	r	+	+
	25	B92870,1	s	-	-
Variedades	26	Achirana	t	-	-
	27	Astrid	s	-	-
	28	Atlantic	S	-	-
	29	Chieftain	S	-	-
	30	Commersonii ^{w.s}	n.d	-	-
	31	Cyclamen	t	-	-
	32	Dakota Rose	S	-	-
	33	Flavia	s	-	-
	34	Iporá	r	+	+
	35	Iris	s	-	-
	36	Jazmín	s	-	-
	37	Kelune	s	-	-
	38	Kenebec	S	-	-
	39	Norvalley	S	-	-
	40	NY121	R	+	+
	41	Pucará	s	-	-
	42	Redsen	s	-	-
	43	Roxy	t	-	-
	44	Serrana ^a	H	-	-
	45	W.Lady	t	-	-
	46	Yagana ^a	S	-	-

Genotipos

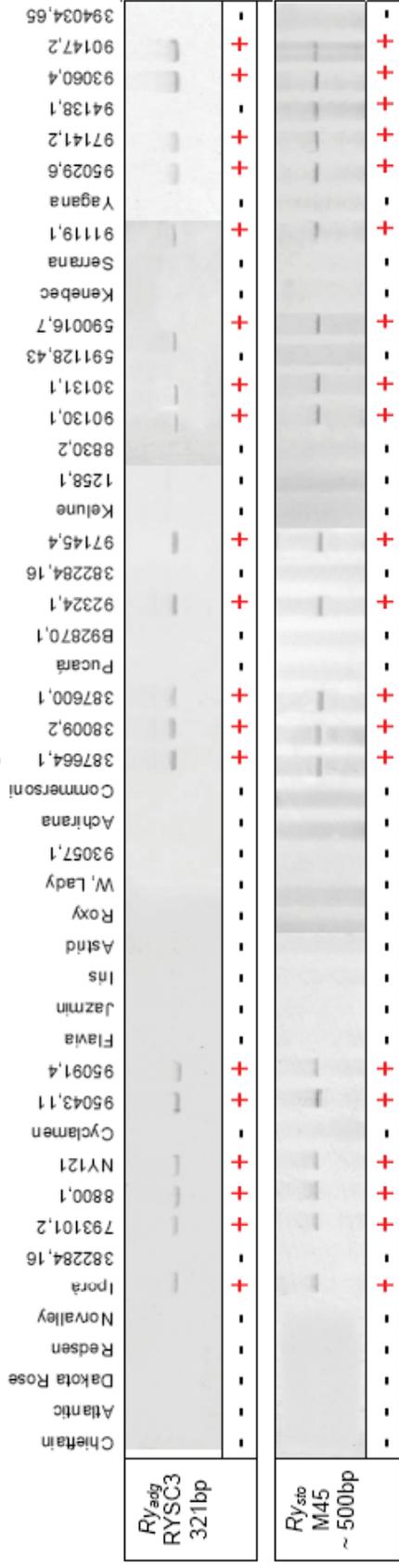


Figura 10. El marcador RYSC3 confirmó en 19 genotipos la resistencia mediada por $R_{Y_{adg}}$. Por su parte el marcador M45 identificó como resistentes estos mismos genotipos, incorporando además el clon 94138,1 a la lista de materiales inmunes. De los 46 genotipos testados el marcador RYSC3 confirmó en 19 de ellos la presencia del gen $R_{Y_{adg}}$. Por su parte el marcador M45 identificó como resistentes estos mismos genotipos, incorporando además el clon 94138,1 a la lista de materiales inmunes

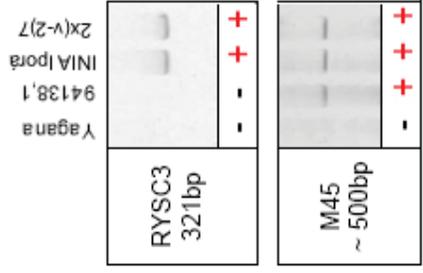


Figura 11. El clon 94138,1 fue el único genotipo que se reveló positivo para M45 y negativo para RYSC3 atribuyéndose a una resistencia mediada por $R_{Y_{sto}}$. M45 también identificó como resistente al parental 2x(V-2)7 derivado de *S. tuberosum* ssp. andigena INIA Iporá y Yagana como controles positivos y negativos respectivamente.

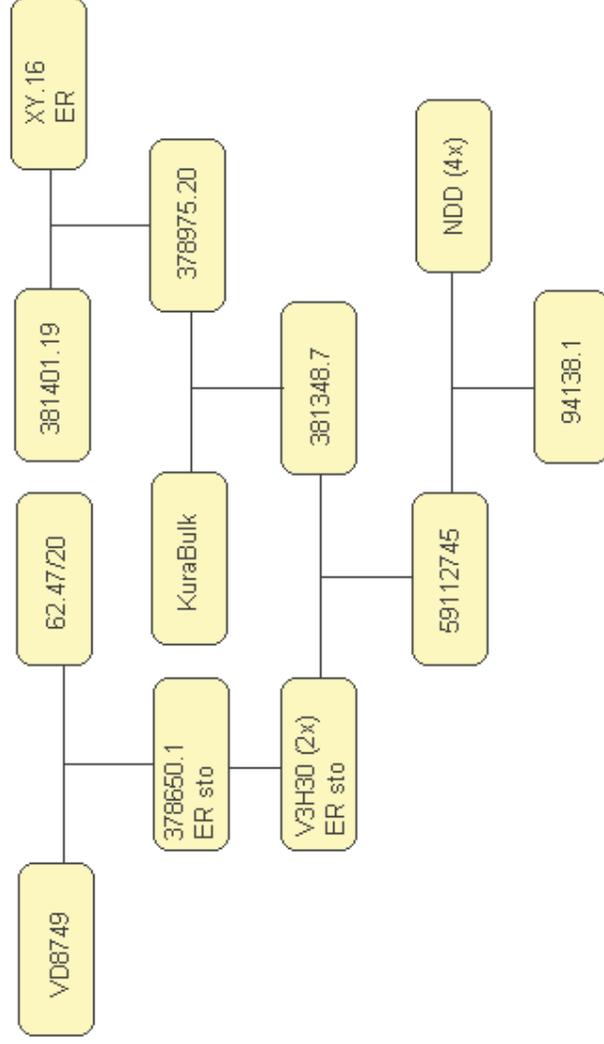


Figura 12. Genealogía del clon 94138.1 se ven materiales resistentes (378650.1, V3H30) con citoplasmas derivados de *S. stoloniferum*. Dicho genotipo es producto de un cruzamiento entre 591127.45 x NDD, los padres del 591127.45 son 86.6045 x V3H30, siendo V3H30 un haploide del clon 378650.1. En ascendencia del parental 591127.45 existen genotipos con ER a PVY con citoplasmas *S. stoloniferum* (Bonierbale com pers).

CONCLUSIÓN

En este trabajo se confirmaron 20 genotipos inmunes a PVY, entre estos la variedad Iporá obtenida localmente y varios clones avanzados.

Se comprobó también que M45 resulta eficiente para testar la presencia de *Ry_{adg}* y no solamente la de *Ry_{sto}* para el cual había sido diseñado y reportado. Esta capacidad de identificar simultáneamente ambas fuentes de resistencia, lo destaca como una interesante y practica herramienta a incorporar en la selección asistida por marcadores, ya que facilita la elección de progenitores a ser incluidos el desarrollo de variedades resistentes a PVY. Del estudio realizado resulta relevante el alto porcentaje de genotipos locales resistentes, evidenciando el interés prestado en el programa en incorporar este tipo de resistencia en el desarrollo de sus variedades, ya que el mismo confiere una protección efectiva contra todas las cepas de PVY.

BIBLIOGRAFÍA

- AGRIOS, G.N.**, (1999). Plant Pathology, Fourth Edition. *Academic Press*.
- ARNEDO, A. M. S., ORTEGA, R. G., ARTEAGA, L. M., HORMAZA, J. I.** (2002) Development of RAPD and Scar markers linked to *Pvr4* locus for resistance to PVY in pepper (*Capsicum annuum* L.) . *Theor. Appl. Genet.*, **105**, 1067-1074.
- BARKER, H.** (1997) Extreme resistance to potato virus V in clones of *Solanum tuberosum* that are also resistant to potato viruses Y and A: evidence for a locus conferring broad-spectrum resistance. *Theor. Appl. Genet.*, **95**, 1258-1262.
- BENT, A.F.** (1996) Plant Disease Resistance Genes: Function Meets Structure. *Plant Cell* **8**, 1757-1771.
- BOGDANOVE, A.J.** (2002) Pto update: recent progress on an ancient plant defense signaling pathway. *Molecular Plant Pathol* **3**: 283-288.
- BRIGNETI, G., GARCIA-MAS, J., BAULCOMBE, D.C.** (1997) Molecular Mapping of potato virus Y resistance gene Rysto in potato. *Theor. Appl. Genet.*, **94**, 198-203.
- BUCHANAN, B.B., GRUISSEM, W., JONES, R.L.** (2000) Biochemistry & Molecular Biology of Plants. *Textbook, American Society of Plant Physiologists*.
- CELEBI-TOPRAK, F., SLACK, S.A., JAHN, M.M.**, (2002) A new gene, *Ny_{1br}*, for hypersensitivity to Potato virus Y. *Theor. Appl. Genet.*, **104**, 669-674.
- COCKERHAM, G.** (1958) Experimental breeding in relation to virus resistance. In: Quak, F., Dijkstra, J., Beemster, A. B. R. and van der Want, J. P. H. (eds) *Proceedings of the 3rd Conference Potato Virus Diseases. Lisse-Wageningen H. Veenman & Zonen, Wageningen*. 199-203.
- COCKERHAM, G.** (1970) Genetical studies on resistance to potato viruses X and Y. *Heredity*, **25**, 309-348.
- DALLA RIZZA, M., REAL, D., QUESENBERRY, K.H., ALBERTINI, E.**, (2004). Plant reproductive system determination under field conditions based on codominant markers. In press. *Journal of genetics and breeding*.
- DAVIDSON, T. M. W.**, (1980) Breeding for resistance to virus disease of the potato (*Solanum tuberosum*) at the Scottish Plant Breeding Station. In: Scottish Plant Breeding Station 59th. *Annual Report Scottish Plant Breeding Station, Edinburgh*. 100-108.
- DiFONZO, C.D, RAGSDALE, D.W, RADCLIFFE E.D**, (1996). Integrated Management of PLRV and PVY in Seed Potato, with Emphasis on the Red River Valley of Minnesota and North Dakota. <http://ipmworld.umn.edu/chapters/difonzo.html>.
- DIXON, M.S., JONES, D.A., KEDDIE, J.S., THOMAS, C.M., HARRISON, K., AND JONES, J.D.G.** (1996) The tomato *Cf-2* disease resistance locus comprises two functional genes encoding leucine-rich repeat proteins. *Cell* **84**, 451-459.

- EDWARDS, K., JOHNSTONE, C., THOMPSON, C.,** (1991) A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic Acids Research*, Vol. **19**, No. 6 pag 1349.
- FLIS, B., HENNING, J., STRZELCZYK-ZYTA, D., GEBHARDT, C., HARRISON, K., AND MARCZEWSKI, W.** (2004) The *Ry-f_{sto}* gene from *Solanum stoloniferum* for extreme resistance to *Potato virus Y* maps to potato chromosome XII and is diagnosed by PCR marker GP122₇₁₈ in PVY resistant potato cultivars. *Aun sin publicar*.
- FLOR, H.H.** (1956) The complementary genic system in flax and flax rust. *Advan Genet* **8**, 29-54.
- FLOR, H.H.** (1971) Current status of gene for gene concept. *Annu Rev Plant Phytopatology* **9**, 275-296.
- FRANCO, J.** (2002) El cultivo de la papa en Guatemala. 1^{ra} edición.
www.icta.gob.gt/pdfs/cuttivopapa.PDF
- GALVÁN, G.** (1991) Inoculación masiva con PVY y PVX en la selección por resistencia a virus en papa. Tesis de Graduación. Universidad de la República, Facultad de Agronomía.
- GEBHARDT, C., VALKONEN J.P.T.** (2001) Organization of genes controlling disease resistance in the potato genome. *Annu. Rev. Phytopathol* **39**, 79-102.
- HÄMÄLÄINEN, J.H., SORRI, V A., WATANABE, K N., GEBHARDT, C. AND VALKONEN, J.P.T.,** (1998) Molecular examination of a chromosome region that controls resistance to potato Y and A potyvirus in potato. *Theor. Appl. Genet.*, **96**, 1036-1043.
- HÄMÄLÄINEN, J.H., WATANABE, K.N., VALKONEN, J.P.T., ARIHARA, A., PLAISTED, R.L., PEHU, E. ET AL.** (1997). Mapping and marker-assisted selection for a gene for extreme resistance to potato virus Y. *Theor. Appl. Genet.*, **94**, 192-197.
- HAMMOND-KOSACK, K., AND JONES, J.** (1997) Plant disease resistance genes. *Annu Rev Plant Physiol Plant Molec Biol* **48**, 575-607.
- HUTTON, E.M.,** (1957). Possible genotypes conditioning virus resistance in the potato and tomato. *J. Aust. Inst. Agric. Sci.*, **17**, 132-138.
- JONES, D.A., THOMAS, C.M., HAMMOND-KOSACK, K.E., BALINT-KURTI, P.J., AND JONES, J.D.G.** (1994) Isolation of the tomato *Cf-9* gene for resistance to *Clasosporium fulvum* by transposon tagging. *Science* **266**, 789-793.
- JONES, R.A.C.,** (1990). Strain group specific and virus specific hypersensitive reactions to infection with potyviruses in potato cultivars. *Ann. appl. Biol.*, **117**, 93-105.
- KASAI, K., MORIKAWA, Y., SORRI, VA., VALKONEN, J.P.T., GEBHARDT, C., WATANABE, K.N.,** (2000) Development of SCAR markers to the PVY resistance gene *Ry_{adg}* based on a common feature of plant disease resistance genes. *Genome.*, **43**, 1-8.

- LEISTER, D., BALLVORA, A., SALAMINI, F., GEBHARDT, C.,** (1996). A PCR-based approach for isolating pathogen resistance genes from potato with potential for wide applications in plants. *Nature Genet.*, **14**, 421-429.
- MARTIN, G.B., BOGDANOVA, A.J., AND SESSA, G.** (2003) Understanding the functions of plant disease resistance proteins. *Annu Rev Plant Biol* **54**, 23-61.
- MUÑOZ, F.J., PLAISTED, R.L., THURSTON, H.D.** (1975) Resistance to potato virus Y in *Solanum tuberosum* ssp. *andigena*. *Am. Potato J.*, **52**, 107-115.
- NEWTON, C.R., GRAHAM, A.,** (1994) PCR. © BIOS Scientific Publishers Limited.
- ROSS, H.** (1961) . Über die Vererbung von Eigenschaften für Resistenz gegen das Y- und A- virus in *Solanum stoloniferum* und die mögliche Bedeutung für eine allgemeine Genetik der Virusresistenz in *Solanum* sect. *Tuberosum*. In: Proceedings of the 4th Conference Potato Virus Diseases, Braunschweig, 1960, pp. 40-49. H. Veenman & Zonen, ageningen.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., MANIATIS, T.,** (1989) Molecular Cloning, a laboratory manual, second edition. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*.
- SECOR, G.A., RIVERA, V.V.,** (2004). Emerging diseases of cultivated potato and their impact on Latin America. *Suplemento Revista Latinoamericana de la Papa*.
- SOLOMON, R.M., BARKER, H.** (2001)^a A review of host major-gene resistance to potato viruses X, Y, A and V in potato: genes, genetics and mapped locations. *Heredity*, **86**, 8-16.
- SOLOMON, R.M., BARKER, H.** (2001)^b Breeding virus resistant potatoes (*Solanum tuberosum*): a review of traditional and molecular approaches. *Heredity*, **86**, 17-35.
- STASKAWICZ, B.J., AUSUBEL, F.M., BAKER, B.J., ELLIS, J.G., JONES, J.D.G.** (1995) Molecular genetics of plant disease resistance. *Science*, **268**, 661-667.
- VALKONEN, J. P. T., JONES, M. G. K., GIBSON, R. W.** (1991) Resistance in *Solanum brevidens* to both potato virus Y and potato virus X may be associated with slow cell-to-cell spread. *J. Gen. Virol.*, **72**, 231-236.
- VALKONEN, J.P.T., JONES, R.A.C., SLACK, S.A., WATANABE, K.N.** (1996) Resistance specificities to virus in potato: standardisation of nomenclature. *Pl. Breed.*, **115**, 433-438.
- VALKONEN, J.P.T., SLACK, S.A., PLAISTED, R.L., WATANABE, K.N.** (1994). Extreme resistance is epistatic to hypersensitive resistance to potato virus Y^o in a *Solanum tuberosum* subsp. *andigena*-derived potato genotype. *Plant Dis.*, **78**, 1177-1180.
- VIDAL, S., CABRERA, H., ANDERSSON, R.A., FREDRIKSSON, A., VALKONEN, J.P.T.,** (2002) Potato gene *Y-I* is a *N* gene Homolog that confers cell death upon infection with potato virus Y. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, **15**, 717-27.