

UTILIZACION DE MARCADORES BIOQUIMICOS Y MOLECULARES EN EL MEJORAMIENTO GENETICO DE LA PAPA

Lourdes Iglesias

INTRODUCCION

Desde el redescubrimiento de las leyes de Mendel, hace ya casi un siglo, los genetistas se han dedicado a identificar, catalogar y mapear marcadores genéticos simples en diversas especies de plantas, como una vía para acelerar los procesos de mejoramiento genético. Prueba convincente del amplio trabajo que se ha desarrollado en esta dirección desde hace más de 50 años lo constituyen, entre otros, los mapas de ligamientos que se han establecido tanto en los cultivos de tomate (Mac Arthur, 1934) como en maíz (Emerson, Beadle y Fraser, 1935). Sin embargo, debido a los problemas de heterocigosidad y poliploidía que caracterizan al cultivo de la papa, resultaba muy difícil lograr la construcción de un mapa de ligamiento genético en este cultivo; por ello, durante muchos años solo se contaron con algunos casos aislados de ligamiento entre unos pocos marcadores morfológicos.

Claro está que estos marcadores tuvieron en general muy poca utilidad en los programas de mejoramiento de la papa, debido a algunas limitaciones, entre las que se encuentran:

- se expresan en estadios específicos del desarrollo o en algunos tejidos u órganos de la planta
- poseen un número poco elevado de loci asequibles al análisis
- son altamente influidos por el ambiente y no resultan fácil-

mente comprensibles a nivel génico

- pueden tener efectos pleiotrópicos secundarios sobre caracteres de importancia económica.

Todas estas limitaciones unidas a la complejidad genética de la papa, hacían en general muy difícil tanto la detección como el uso de los mismos en los programas de mejoramiento que se desarrollaban en este cultivo.

Es por ello, que la utilización como tal de los marcadores genéticos, particularmente en el cultivo de la papa, tuvieron que esperar el advenimiento de técnicas bioquímicas y moleculares como son: las técnicas isoenzimáticas y el polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción, esta última más conocida por las siglas de RFLP, las cuales, en general, poseían un conjunto de ventajas, dentro de las cuales estaban:

- permiten efectuar la detección de los genotipos a los niveles celular, tisular y de la planta como un todo
- permiten detectar un número elevado de alelos múltiples
- la mayoría de los alelos son heredados de forma estable (herencia simple mendeliana) y presentan un tipo de expresión codominante, lo que posibilita la detección de todos los genotipos en cualquier generación de segregación
- no presentan efectos epistáticos y(o) pleiotrópicos, siendo por lo regular estos silentes en su efecto sobre el fenotipo
- permiten detectar tanto la variación de genes estructurales como no estructurales, lo que posibilita obtener estimados más precisos de la variación genética e informar sobre la naturaleza de esa variación

- permiten efectuar estudios retrospectivos y post-mortem.

De este modo, no fue hasta 1987 que Douches y Quiros abrieron las puertas a un trabajo más completo de mapeo genético en papa, al monitorear mediante el empleo de marcadores isoenzimáticos, la segregación de la progenie del cruce interespecífico de dos especies diploides de papa. Más adelante mediante el uso de marcadores moleculares RFLP, Bonierbale, Plaisted y Tanksley (1988) lograron establecer un mapa completo de ligamiento en papa utilizando para ello la progenie segregante del cruce entre *S. phureja* y un híbrido proveniente del cruce entre *S. tuberosum* y *S. chacoense*. Posteriormente, Gebhardt *et al.* (1989b) construyó un segundo mapa de ligamiento analizando la progenie de un cruce entre clones diploides de *S. tuberosum*.

En la figura 1 se muestra el mapa de ligamiento genético establecido por Bonierbale, Plaisted y Tanksley (1988), donde aparecen los 184 marcadores, tanto de ADN como isoenzimáticos, ubicados en los 12 cromosomas de papa. Cabe resaltar el valor de estos resultados, por cuanto al emplearse simples sondas de ADN de tomate en la confección del mismo, proporcionaron la base para establecer un puente entre la genética de la papa y la del tomate, sobre la base de la existencia de un alto grado de homología detectada en las secuencias nucleotídicas de ambas especies cultivadas. De acuerdo con Zamir y Tanksley (1988), los genomas de la papa y el tomate solo difieren en la presencia de cuatro inversiones paracéntricas, que implican a tres cromosomas homólogos, así como en las secuencias altamente repetitivas de

Dra. Lourdes Iglesias, Investigador Titular del departamento de Genética y Mejoramiento Vegetal, Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, Gaveta Postal No. 1, San José de las Lajas, La Habana, Cuba

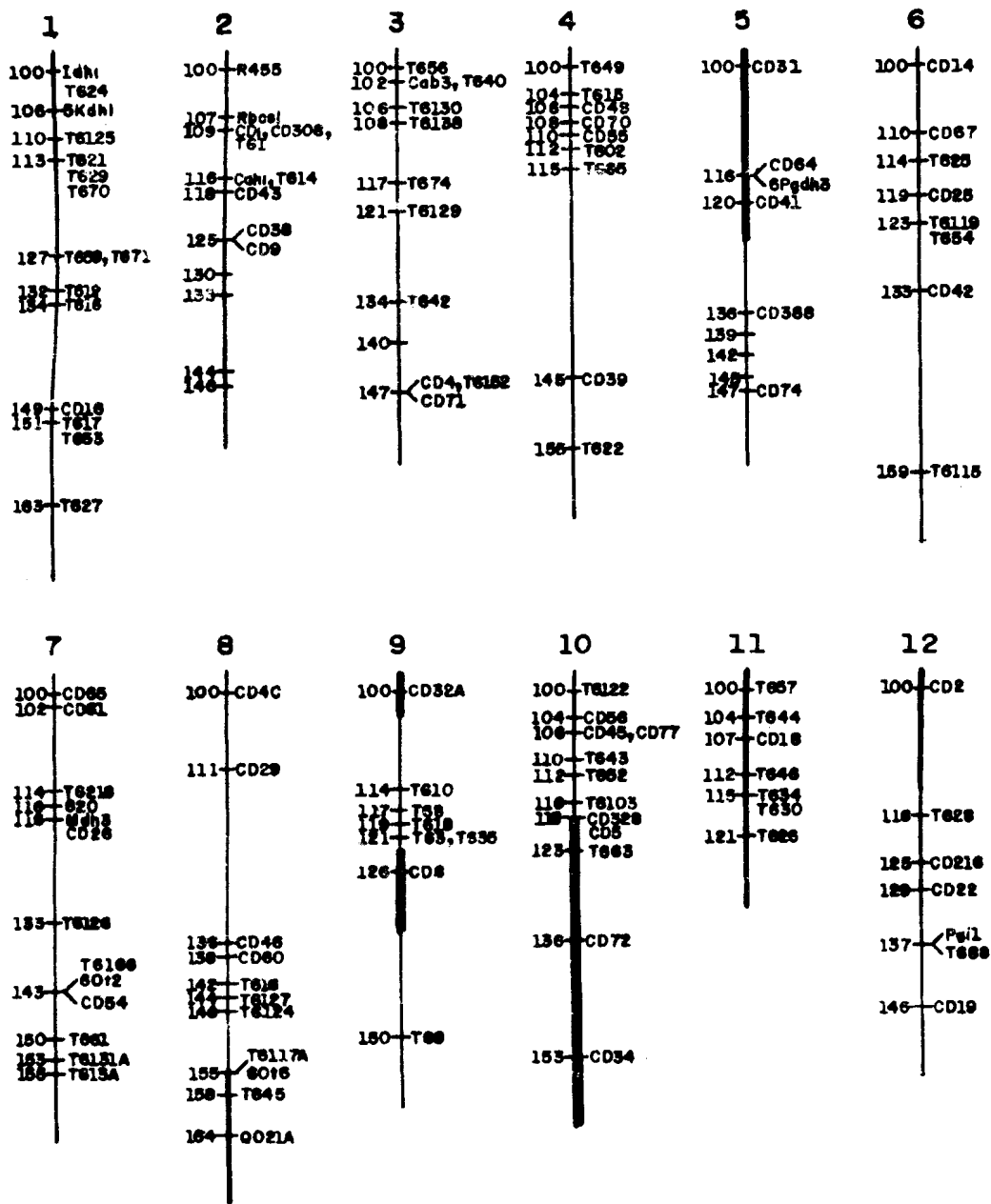


Figura 1. Mapa de ligamiento genético de la papa construido a partir de la segregación de marcadores moleculares del cruce *S. phureja* x (*S. tuberosum* x *S. chacoense*) según Bonierbale et al. (1988).

dichas especies. Al respecto, Ganal, Lapitan y Tanksley (1988) y Schweizer et al. (1988) apuntaban, que solamente una de las tres secuencias de ADN no ribosomal altamente repetitivas, detectada en tomate, se encontraba también presente en el genoma de la papa.

Es así que, considerando la notable conservación evolutiva

presente en la mayoría de las regiones codificantes de dichas especies, es factible predecir la posición de cualquier loci, ya sea isoenzimático como molecular, que haya sido previamente mapeado en el genoma del tomate, directamente en el genoma de la papa. Ejemplo de ello lo constituye la reciente localización cromosómica efectuada por Tanksley, Bonierbale y Park (1980) de los genes

que codifican para la proteína de reserva patatina en ambas especies.

Este último aspecto cobra especial importancia para llegar a conocer la homología y ortología de genes que no han sido aún clonados y cuyos productos génicos aún no se conocen. Es por ello que, como indicara Bonierbale, Plaisted y Tanksley (1988), las po-

siciones comunes de mapa pueden ser usadas para inferir homología de genes de resistencia a enfermedades en ambas especies y extrapolar teorías relacionadas con la herencia y los mecanismos de acción génica de los mismos.

Por otra parte, el hecho de que los contenidos cromosómicos de ambas especies se hayan conservado, ofrece la posibilidad de producir líneas de sustitución cromosómica que pudieran, como plantearan Bonierbale, Plaisted y Tanksley (1988), ser usadas como un paso intermedio en la introgresión de genes en dichas especies. De este modo los largos segmentos homocuenciales de cromosomas detectados, pudieran facilitar la recombinación homóloga en la meiosis de futuras líneas recombinantes, que pudieran derivarse de los productos de fusión somática.

Ahora bien, aparte de las posibilidades teórico-prácticas que se derivan de las aplicaciones antes mencionadas, los marcadores bioquímicos y moleculares pueden ser empleados, además con diversos propósitos en los programas de mejoramiento genético de plantas.

Al respecto, cabe señalar que algunos autores como Soller y Beckmann (1983) han indicado que, de acuerdo con el tipo de aplicación, los marcadores pueden ser agrupados, en función de si su empleo está más bien dirigido a determinar relaciones genéticas o si su uso consiste fundamentalmente en el mapeo de genes involucrados en la determinación de caracteres cuantitativos QTL y su posterior monitoreo en los programas de introgresión y selección.

De cualquier forma, cabe significar que los marcadores bioquímicos y moleculares parecen tener, como apuntaron Burr *et al.* (1988), su mayor aplicación en plantas que se propagan asexualmente, puesto que entre otras, permiten incrementar la efectividad de las prácticas actuales y futuras en el mejoramiento genético de cultivos, que como la papa por ser tetraploide y poseer un modo de herencia tetrasómica, resulta mucho más costosa y difícil efectuar la selección, incluso de caracteres

que posean un tipo de herencia simple mendeliana.

En general puede señalarse, que tanto los marcadores bioquímicos como los moleculares resultan particularmente útiles para:

- identificación de variedades: determinación de la pureza varietal
- determinación de las relaciones de parentesco: detección de posible origen híbrido de especies poliembríonicos apomicticas
- screening de los recursos genéticos con vistas a la detección de alelos útiles
- examinar la variación genética existente en poblaciones naturales y explorar las relaciones evolutivas entre diferentes taxas
- determinación de las relaciones filogenéticas en diferentes géneros, así como detección del origen y la diseminación geográfica de las especies
- análisis de la coevolución de los genomas nucleares y citoplasmáticos. Brindar información sobre procesos de especiación y evolución
- identificar, mapear y medir los efectos de loci cuantitativos: QTL
- incrementar la eficiencia de la transferencia de genes útiles
- posibilitar mapeo de QTL y evaluar tanto sus propiedades individuales como sus interacciones
- screening de diferentes genes de resistencia a enfermedades simultáneamente. Detección de patógenos virales
- monitorear trabajos de variación somaclonal, micropropagación y conservación *in vitro*
- monitorear trabajos relacionados con la fusión de protoplastos y regeneración de plantas: caracterización molecular de líneas celulares
- análisis de compatibilidades genoma/plastoma en híbridos
- distinguir líneas androestériles en diversos cultivos y profundizar cómo operan los mecanismos de androesterilidad
- obtener información sobre la regulación de la información genética, recombinación gené-

tica y procesos morfogenéticos, que nos puedan dar una idea más global de la estructura y función génica

- análisis de la organización del genoma y la estabilidad de orden génico tanto dentro como entre especies
- determinación de la posible base molecular de la heterosis y la acción génica diferencial en el desarrollo de organismos superiores
- identificación de cromosomas: efectos de dosaje genético
- análisis del número de copias, complejidad de genes estrechamente relacionados: evolución de secuencias únicas, repetidas, etcétera.

Para ilustrar algunas de las posibilidades que brinda el empleo de estos marcadores, particularmente en el mejoramiento de la papa se abordará, en primera instancia, lo correspondiente a su uso en la identificación de variedades, por cuanto es factible lograr por esta vía:

- garantizar una adecuada homogeneidad genética en las poblaciones de trabajo con la eliminación de posibles mezclas varietales, que por lo regular se presentan tanto en los trabajos propiamente de mejoramiento como de producción de semillas, especialmente en cultivos que se caracterizan por presentar cierto grado de alogamia, y
- facilitar los trabajos de manejo de los recursos fitogenéticos de la papa, al posibilitar por esta vía efectuar la eliminación de entradas duplicadas, a la vez que permite establecer catálogos completos del germoplasma disponible, con lo cual se puede lograr una adecuada protección del germoplasma disponible.

Debido precisamente a todas las ventajas que ofrece el uso de los marcadores genéticos en esta dirección, desde hace años diversos autores (Douches, Ludlam y Vargas, 1989; Sharon Desborough y Peloquin, 1968; María R, Blanchini y María C. Monti, 1988; Oliver y Martínez-Zapater, 1985; Sharon Desborough, 1983; Grison *et al.*, 1979; Stegemann y Loeschke, 1978; Zhacarius, Krulic y

Porter, 1971 y Zwartz, 1966); han desarrollado un intenso trabajo que ha permitido la elaboración de catálogos completos de variedades de papa, sobre la base del empleo fundamentalmente de marcadores bioquímicos detectados en tubérculos de papa.

Sin embargo, al tratar de transferir estos resultados a nuestras condiciones, se comprobó que aunque los análisis de isoenzimas Peroxidasas en tubérculos de papa mostraban un notable polimorfismo varietal y una adecuada resolución electroforética, como se puede apreciar en la foto 1, no se obtenía en general una buena repetibilidad en los patrones de bandas.

Esto conllevó a que empleásemos en su lugar muestras de tejido foliar de plántulas de papa cultivadas *in vitro* o en invernadero, con el fin de disponer de un método no destructivo, temprano, eficaz y sobre todo repetible de identificación varietal en este cultivo.

Los resultados obtenidos en esta dirección (Lourdes Iglesias, datos no publicados) revelaron, como se puede apreciar en las fotos 2 y 3, un marcado polimorfismo varietal tanto en la composición Peroxidasas como Esterasas, siendo en este último aún mucho más notable la variación detectada.

Sobre la base de estos resultados, se procedió a confeccionar una clave de determinación bioquímica en el cultivo, que puede resultar de utilidad como complemento de los trabajos de identificación temprana que se realizan en este cultivo (Tabla I).

Estos resultados corroboran lo planteado por Gebhardt et al. (1989a) acerca de la existencia de un notable polimorfismo intraespecífico a nivel de ADN en papa. De este modo empleando marcadores RFLP, estos autores fueron capaces de distinguir muchas de las líneas diploides en papa que se emplean en el desarrollo de variedades tetraploides de este cultivo.

Cabe significar que algunos países de la región como Perú y

Uruguay, se encuentran aplicando la técnica de RFLP en los trabajos de identificación y caracterización que se realizan en este cultivo. Dentro de este contexto, cabe particularmente resaltar el trabajo desarrollado por Douches, Freyre y Hicks (1991), quienes empleando nueve combinaciones de sonda/enzima de restricción lograron resolver 50 fragmentos polimórficos en las 14 variedades de papa cultivadas que se examinaron.

Como indicaran Bonierbale, Plaisted y Tanksley (1991), los perfiles RFLP están siendo ampliamente empleados, en el estudio de la diversidad alélica existente en los cultivares de papa de Norte América y de Europa.

Además de su uso en la identificación de variedades, los perfiles de RFLP proporcionan una adecuada base para medir la distancia entre variedades e individuos.

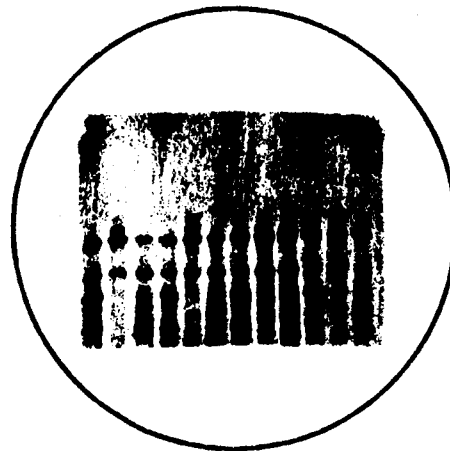


Foto 1. Isoenzimas Peroxidasas en tubérculos de variedades de papa cultivadas

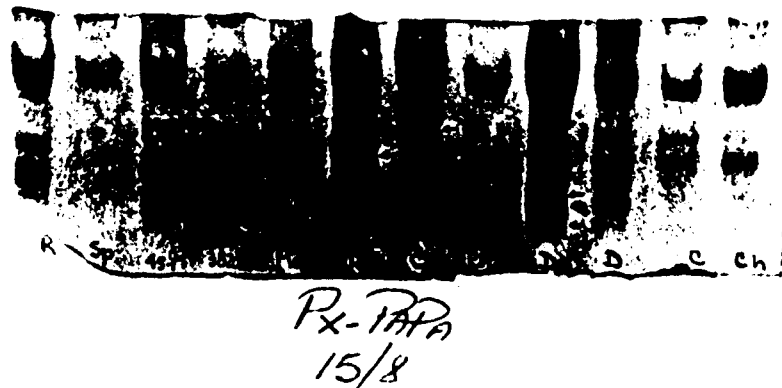


Foto 2. Isoenzimas Peroxidasas en variedades de papa cultivadas *in vitro*



14

Foto 3. Isoenzimas Esterasas en variedades de papa cultivadas *in vitro*

Tabla 1. Clave de determinación bioquímica en papa mediante el empleo de los diagramas electroforéticos de isoenzimas esterazas

<ul style="list-style-type: none"> ▣ Presencia bandas Est 1 y Est 4 ▣ Presencia bandas Est 7 y Est 9 ▲ Presencia banda Est 11 △ Ausencia banda Est 11 	382053-23 Desirée
<ul style="list-style-type: none"> □ Ausencia bandas Est 7 y Est 9 ▲ Presencia banda Est 11 ▶ Presencia banda Est 10 ▷ Ausencia banda Est 10 * Presencia banda Est 3 * Ausencia banda Est 3 △ Ausencia banda Est 11 	Claudia Murca Lt-6 Maxilla
<ul style="list-style-type: none"> ▣ Presencia banda Est 7 y ausencia banda Est 9 □ Ausencia banda Est 7 y presencia banda Est 9 	382053-6 Matilde
<ul style="list-style-type: none"> ○ Presencia banda Est 1 y ausencia banda Est 4 ▣ Presencia bandas Est 7 y Est 9 ▲ Presencia banda Est 11 △ Ausencia banda Est 11 ▼ Presencia banda Est 2 ▽ Ausencia banda Est 2 	800938 Baraka Libera Kondor
<ul style="list-style-type: none"> ▣ Presencia banda Est 7 y ausencia banda Est 9 □ Ausencia banda Est 7 y presencia banda Est 9 ▲ Presencia banda Est 11 ● Presencia banda Est 2 ○ Ausencia banda Est 2 △ Ausencia banda Est 11 	Rosita Almar Comisa 1882
<ul style="list-style-type: none"> □ Ausencia bandas Est 7 y Est 9 ▲ Presencia banda Est 11 ● Presencia banda Est 3 ○ Ausencia banda Est 3 ▶ Presencia banda Est 10 ▷ Ausencia banda Est 10 	Chieftain Granola 382032-6 Ch-1-*
<ul style="list-style-type: none"> ○ Ausencia banda Est 1 y presencia banda Est 1 ▣ Presencia bandas Est 7 y presencia banda Est 9 Presencia banda Est 10 Ausencia banda Est 10 	Prigodski Libelle
<ul style="list-style-type: none"> ○ Ausencia bandas Est 1 y Est 4 ▣ Presencia bandas Est 7 y Est 9 □ Ausencia bandas Est 7 y Est 9 ▣ Presencia banda Est 7 y ausencia banda Est 9 	Mariela Madonna Spunta

Dentro de este contexto, cabe recordar que los marcadores bioquímicos y moleculares han resultado asimismo de gran utilidad como una herramienta rutinaria, para medir la variación, tanto intra como interespecificamente en papa (Hosaka y Hanneman, 1991; Oliver y Martínez-Zapater, 1984; Hosaka y Matsubayashi, 1983; Rickerman y Desborough, 1978).

Desde el punto de vista isoenzimático, los resultados obtenidos por Lourdes Iglesias (datos no publicados) han revelado la existencia de una amplia diversidad bioquímica en un grupo de variedades de papa cultivadas que se examinaron, las cuales como se aprecia en la figura 2 fueron clasificadas mediante un análisis factorial de correspondencias múltiples en cinco grupos.

En general, el empleo de los marcadores genéticos para examinar la variación genética existente en este cultivo, puede ser de gran utilidad para esclarecer algunas ambigüedades que aún persisten en la taxonomía de *Solanum*, a la vez que pueden derivarse otras aplicaciones relacionadas con el

uso de los recursos genéticos de la papa. Así, las mediciones cuantitativas de la variabilidad tanto dentro como entre especies de *Solanum* puede ser de gran utilidad para adoptar decisiones en las colecciones de germoplasma y en los programas de mejoramiento, encaminados a la utilización de fuentes de caracteres deseables presentes en los parientes de la papa cultivada.

Al respecto, cabe resaltar los resultados obtenidos por Bonliebale, Ganal y Tanksley (1990), quienes mediante el empleo de marcadores RFLP, examinaron la variación tanto intra como interespecifica en papa. En la figura 3 se presentan los estimados de distancias genéticas entre individuos de las especies *S. demissum* y *S. chacoense* y los estimados de distancia genética entre 18 especies de *Solanum* y dos de *Lycopersicon*. De hecho, el conocimiento de la variabilidad genética entre especies constituye un prerrequisito para su uso en las poblaciones segregantes, en los cuales puedan ser identificados los marcadores para los genes de interés durante diversos estudios genéticos y(o) en los trabajos de introgresión por retrocruzamientos.

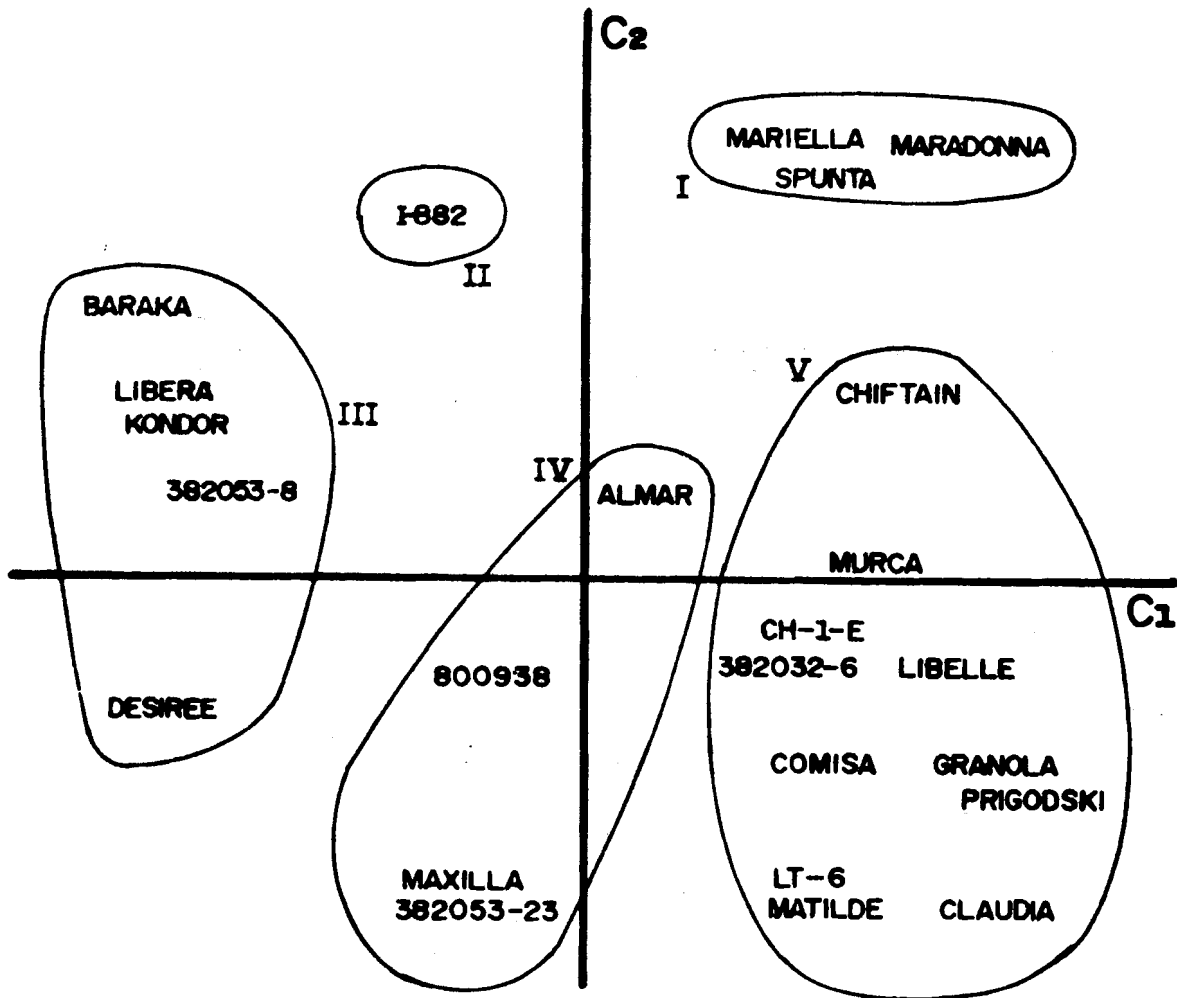


Figura 2. Representación esquemática en los planos factoriales 1 y 2 de la diversidad en la composición de isoenzimas esterases de un grupo de variedades de papa

Se deben asimismo significar los resultados obtenidos entre otros por Oliver y Martínez-Zapater (1984), quienes estimaron la heterociguidad de 13 loci aloenzimáticos en materiales diploides de papa en un 9-16 % y de un 36-38 % en *S. tuberosum* spp *andina* y spp *tuberosum* respectivamente, así como los obtenidos por Gebhardt et al. (1989b), quienes mediante marcadores moleculares estimaron la heterociguidad de 38 materiales diploides de papa en un 36 % y de otros 20 cultivares en un 52 %. Similarmente Douches, Ludlam y Vargas (1989), empleando marcadores isoenzi-

máticos, obtuvieron estimados de los niveles de heterociguidad clonal.

De igual forma, basado en los patrones de restricción de ctDNA que posibilitaron a Heinhorst et al. (1988) establecer un mapa de restricción (Figura 4) del genoma cloroplástico de *S. tuberosum*, Hosaka y Hanneman (1988) establecieron sus teorías en relación con el origen de la papa tetraploide cultivada y su historia después de su introducción.

Así, como se puede apreciar en la figura 5, la papa cultivada spp *tuberosum* se distingue del resto de las especies de papa por poseer un ctDNA de tipo T, mientras

que la spp *andigena* posee un ctDNA de tipo A que se encuentra presente en un mayor por ciento de los países de Centro y Sur América.

Dentro de este contexto, cabe destacar que la disponibilidad de un mapa físico y de un banco de clones de ctDNA de papa, conjuntamente con los avances alcanzados en la transferencia de cloroplastos de especies allegadas a este cultivo, pueden ser de utilidad para esclarecer el rol del plastoma en el control de características que, como la tolerancia al frío y al calor, parecen, según Hetherington et al. (1983) y Smillie et

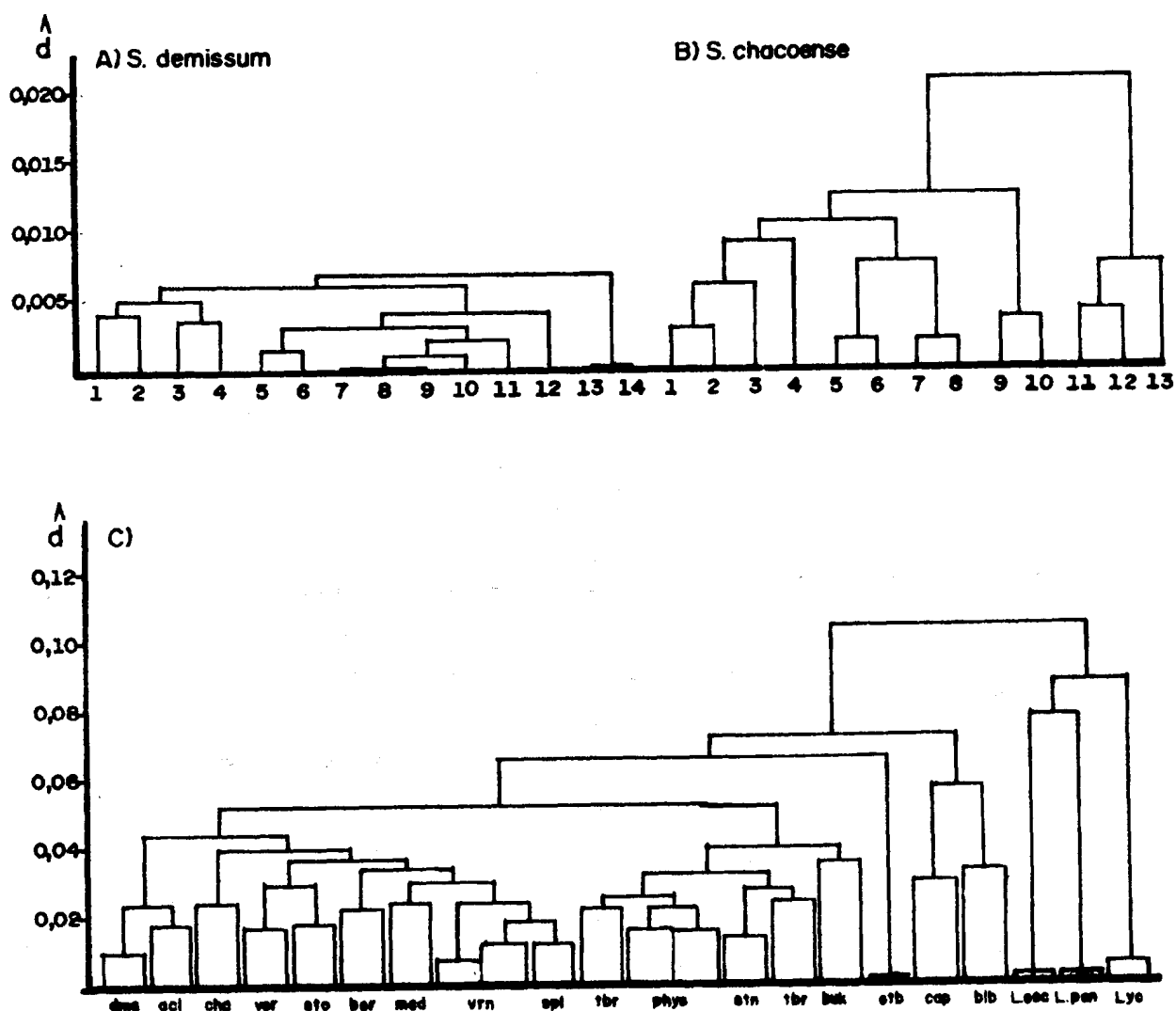


Figura 3. Estimados de distancias genéticas entre individuos de las especies (A) *S. demissum*, (B) *S. chacoense* y (C) entre 18 especies de *Solanum* y dos especies de *Lycopersicon* (Bonierbale et al., 1990).

al. (1983), estar asociadas con cambios en el funcionamiento de los cloroplastos.

Indudablemente, estos resultados brindan la base para acometer estudios de compatibilidades entre el genoma nuclear y el plasmoma en híbridos con núcleo de *S. tuberosum* y cloroplastos de especies allegadas a *Solanum* (Heinhorst et al., 1988), lo cual puede resultar particularmente de interés en el mejoramiento genético de caracteres, que como la tolerancia al calor afectan seriamente la producción agrícola en Cuba.

Además de las aplicaciones ya enunciadas, se ha comprobado (Lourdes Iglesias, datos no publicados) la utilidad del empleo de los marcadores isoenzimáticos para monitorear la posible variación originada en los trabajos de micropropagación (Fotos 4 y 5) de variación somaclonal (Foto 6), que actualmente se encuentran desarrollándose en el cultivo de la papa.

Los avances dentro de este campo han abierto, además, las posibilidades para lograr, mediante el empleo de marcadores moleculares (cpDNA), efectuar la

identificación de los productos de fusión de protoplastos. En la figura 6 se muestran los resultados obtenidos por Pehu et al. (1989), quienes efectuaron la identificación de los productos de fusión de protoplastos entre *S. tuberosum* y *S. brevidens*, en un esfuerzo hacia una mayor comprensión de las reacciones diferenciales que muestran dichas especies al virus del enrollamiento de la hoja (PLRV). Asimismo, Schwizer et al. (1988) han caracterizado secuencias de ADN repetitivas específicas de la especie silvestre *S. acaule* y del

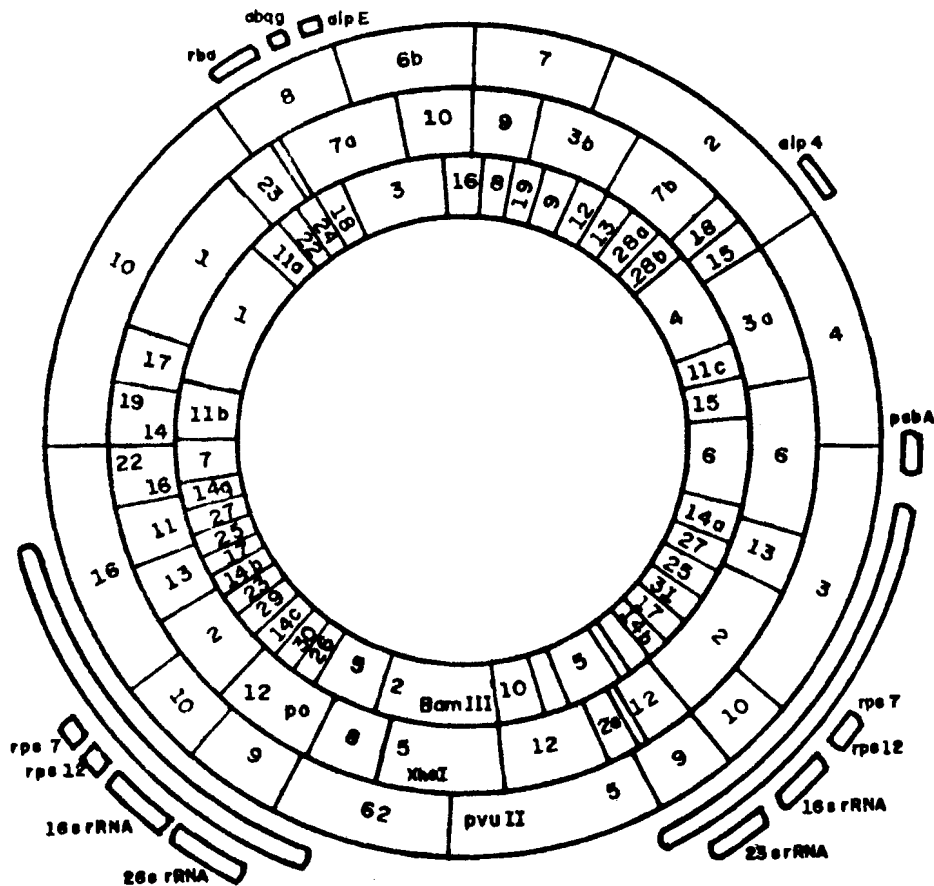


Figura 4. Mapa de restricción circular del genoma cloroplástico de *S. tuberosum* cv. Katahdin (Heinhorst et al., 1988)

tomate cultivado, con vistas a monitorear la composición heterológica de los híbridos somáticos.

Aparte de las ventajas que ofrecen estos marcadores dentro del mejoramiento biotecnológico de la papa, cabe significar las enormes potencialidades que esta ofrece particularmente para identificar, mapear y medir los efectos de QTL que resulten de interés y para hacer posteriormente más eficiente su introgresión a través de los programas de mejora por retrocruzamientos asistidos con estos propios marcadores.

Este último aspecto brinda a los mejoradores de plantas, en general, y a los de papa, en particular, grandes ventajas. Cabe tener en cuenta que por ser la papa tetra-

ploide y poseer un modo de herencia tetrasómica, resulta mucho más costosa y difícil efectuar la selección incluso de caracteres de herencia simple mendeliana. De modo que los trabajos de selección en este cultivo implican el manejo de grandes poblaciones con los consiguientes gastos de recursos humanos y materiales.

De forma general, el mapeo genético basado en marcadores RFLP será más efectivo para efectuar el mejoramiento de papa para caracteres tales como: caracteres multigénicos, caracteres sensibles al ambiente, caracteres difíciles, en general, de seleccionar y caracteres relacionados con resistencia a determinados patógenos y plagas como el tizón tardío, el PLRV, los nemátodos, etcétera.

Por ello, como se puede apreciar en la tabla II, muchos laboratorios se encuentran en la actualidad empeñados en el uso masivo fundamentalmente de los marcadores moleculares con diversos propósitos en el mejoramiento de la papa, pero en particular para identificar y mapear genes involucrados, sobre todo con la resistencia a enfermedades.

Los marcadores RFLP están siendo usados para la identificación de segmentos cromosómicos de *S. brevidens*, que son responsables para la resistencia a *Erwinia* sp. y al PLRV en híbridos con *S. tuberosum*, derivados por fusión de protoplastos (Williams, citado por Bonierbale, Plaisted y Tanksley, 1991). De igual forma, proge-

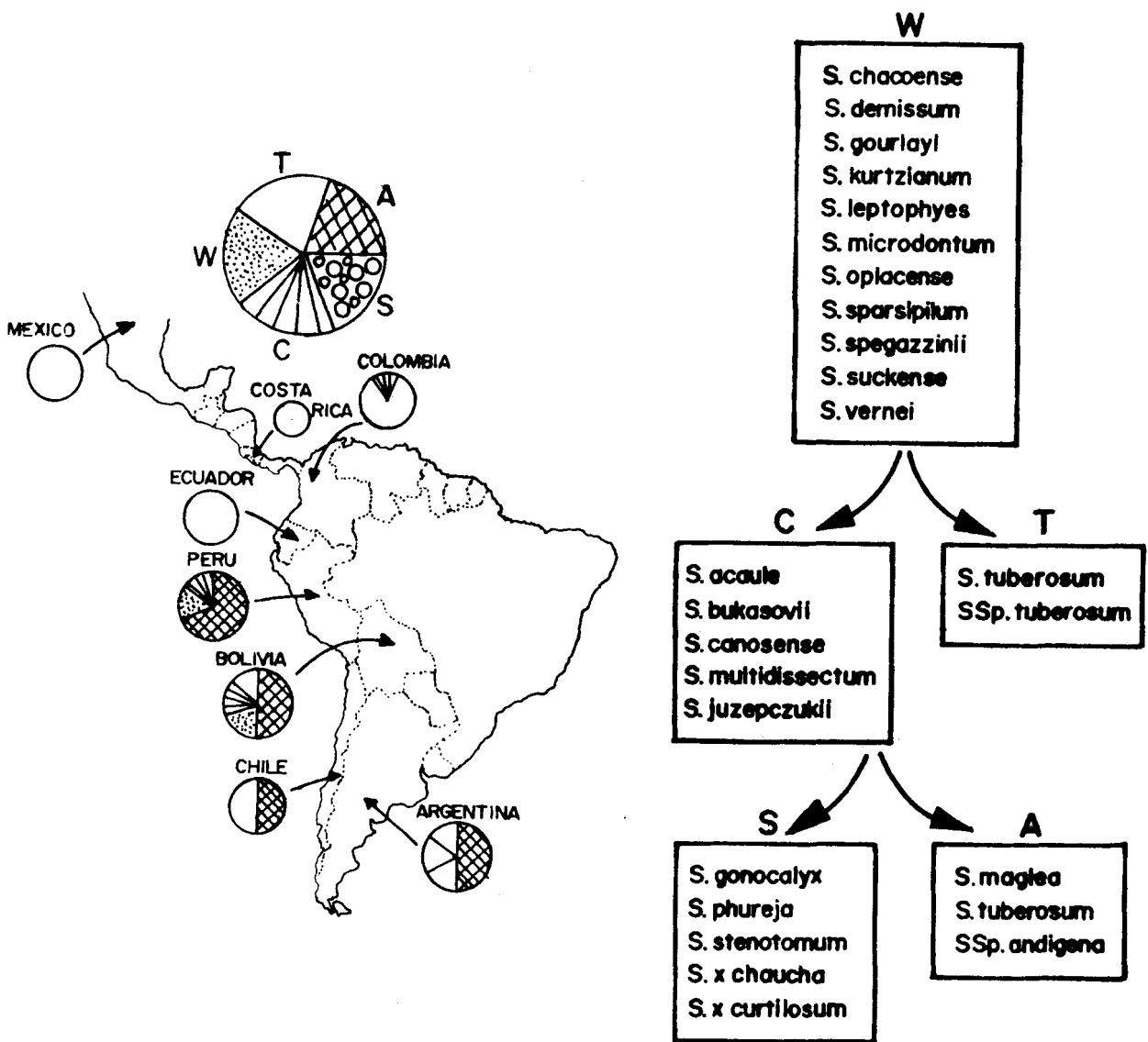


Figura 5. Distribución de ctDNA en *S. tuberosum* y relaciones entre los tipos de ctDNA detectados en papa (Hosaka y Hanneman, 1988)

nies sexuales de cruces entre *S. tuberosum* y *S. berthaultii* están siendo desarrolladas para estudiar cuantitativamente la resistencia a insectos y algunas características correlacionadas con RFLP, así como se están desarrollando paralelamente otros estudios con *S. berthaultii*, con vistas a caracterizar los productos génicos responsables de su resistencia a insectos.

En la figura 7 se muestran los pasos esenciales que conllevaría el proceso de selección asistido por marcadores genéticos. Claro está que mientras más fuerte sea el ligamiento del gen deseado con

uno o varios marcadores bioquímicos y(o) moleculares, mayor eficiencia se podrá lograr en los programas de retrocruzamientos.

De hecho, esta estrategia de trabajo reviste importantes ventajas, por cuanto:

- permite efectuar la transferencia de pequeñas cantidades de ADN conteniendo el gen deseado con una mayor eficiencia

- permite efectuar la determinación del gen deseado en fase de plántulas antes que se haya expresado inclusive el carácter como tal

- no se requiere de pruebas de progenies para la determinación del genotipo y puede llegar a determinarse fácilmente la presencia de genes recesivos

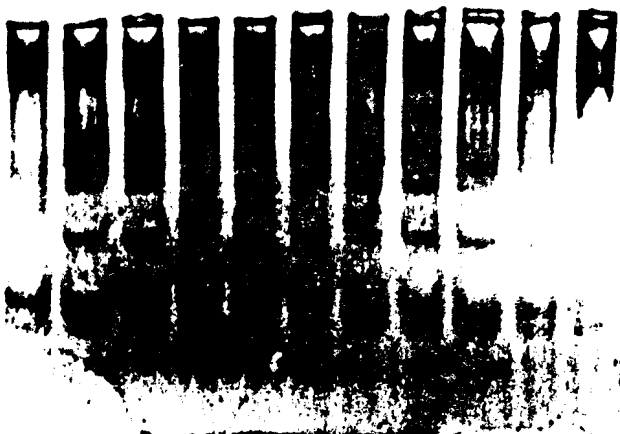
- no existe limitación en cuanto al tipo de carácter que puede ser manipulado por esta vía.

La identificación de productos génicos y localización génica por ligamiento estrecho con marcadores RFLP, guiarán a un mejor entendimiento de la genética, evolución y bioquímica de importantes caracteres, que son difíciles para estudiar por otros medios y



Perox. Papa 10/31

Foto 4. Isoenzimas Peroxidases en tejido foliar de plantulas de la variedad Baraka cultivadas *in vitro*



Est. Papa. 31/10

Foto 5. Isoenzimas Esterasas en tejido foliar de plántulas de la variedad Baraka cultivada *in vitro*

abrir las perspectivas para clonar los genes controladores.

Cabe señalar, además, dentro de este contexto que el empleo de sondas minisatélites puede resultar particularmente útil, para reducir el número requerido de generaciones de retrocruzamientos en los programas de mejoramiento genético. Al respecto, cabe

resaltar el trabajo desarrollado por Brown *et al.* (1991) empleando marcadores con especificidad de especie que, de acuerdo con estos autores, pueden resultar de particular utilidad en los estudios de introgresión.

De cualquier modo, tanto el empleo de marcadores moleculares derivados del empleo de las técnicas de RFLP, polimorfismo de

oligonucleótidos como RAPD permitirán saturar el mapa de ligamiento existente en este cultivo, de modo que se pueda establecer sobre esa base un mapeo físico mediante el empleo de técnicas como la electroforesis en campo pulsante (PFGE). En el caso de la papa, esta técnica ha permitido efectuar un mapeo físico de la región del genoma conteniendo los genes que codifican para patatina (Bonierbale, Plaisted y Tanksley, 1991).

Una vez que se disponga de un mapa físico de los genes de interés y se localicen estos sobre un fragmento particular de ADN, se podrá proceder a efectuar los trabajos de clonaje y transformación de la región clonada en las especies de interés.

Sin dudas, particularmente el uso de marcadores moleculares abre nuevas perspectivas, especialmente a los mejoradores de papa, para lograr avances sustanciales por selección en este cultivo; de ahí la importancia creciente que está cobrando hoy en día el empleo de métodos moleculares en el mejoramiento genético de la papa.

BIBLIOGRAFIA

- Bonierbale, M. W., R. I. Plaisted y S. D. Tanksley. RFLP Maps Based on a Common Set of Clones Reveal Modes of Chromosomal Evolution in Potato and Tomato. *Genetics* (Chapel Hill) 120: 1095-1103, 1988.
- Bonierbale, M. W. Applications of Restriction Fragment Length Polymorphism and Genetic Mapping in Potato Breeding and Molecular Genetics. Ph.D. Bonierbale, M. W. (Ganal, S. D. Tanksley). - En: *The Molecular and Cellular Biology of The Potato*. Londres: CAB International, 1990. p. 21.
- Bonierbale, M. W. Application of Restriction Fragment Length Polymorphism and Genetic Mapping to Potato Breeding. / M. W. Bonierbale, R. Plaisted, S. D. Tanksley. - En: *Molecular Methods for Potato Improvement*. Report of the Planning Conference on Application of Molecular Techniques to Potato Germplasm Enhancement - Lima: CIP, 1991. - p. 149-159.
- Bianchini, María R. y María C. Monti. Identificación de cultivares y clones de papa mediante electroforesis. *Rev. Invest. Agropecuaria* (Buenos Aires) 20(1):117-130, 1988.
- Burr, B. *et al.* Gene Mapping with Recombinant Inbreds in Maize. *Genetics* (Chapel Hill) (118):519-526, 1988.

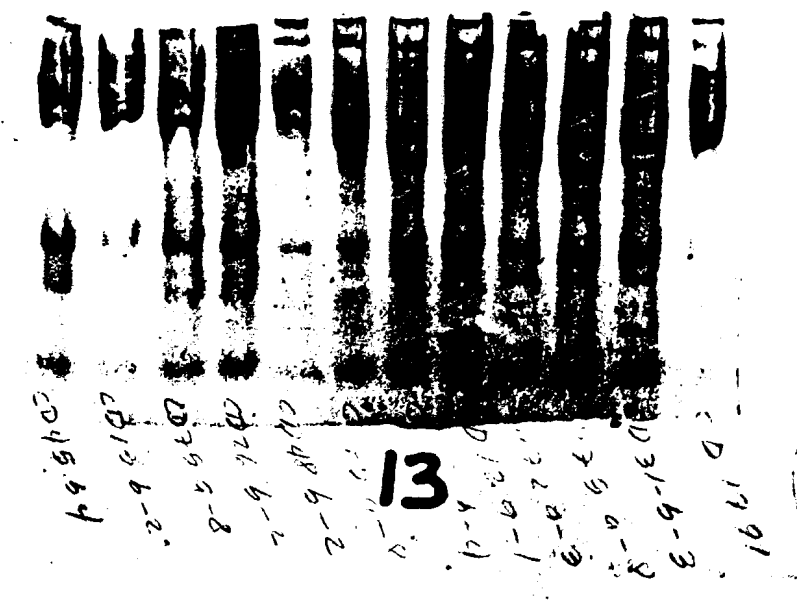


Foto 6. Isoenzimas Esterasas en tejido foliar de somaclones provenientes de la variedad Désirée

Tabla II. Principales líneas de trabajo que se desarrollan actualmente en papa empleando marcadores moleculares (Según Watanabe y Dodds, 1991).

Uso marcadores moleculares	Institución
Desarrollo tecnología básica y mapeo de resistencia a virus a insectos	Universidad de Cornell, E.U.
Mapeo de resistencia a virus y de características agronómicas	Universidad de Kobe, Japón
Mapeo de calidades de procesamiento	Universidad de Michigan, E.U.
Biosistemática y caracterización de especies silvestres y mapeo de resistencia al tizón tardío	Instituto Mack Place, Alemania
Detección de variación somaclonal en la conservación de recursos fitogenéticos	Rothsted, Gran Bretaña
Seguimiento de la introgresión de los genes de especies silvestres en un pool de genes de papa cultivada	Universidad de Washington, E.U.
Estudio de genotipos parentales potenciales relacionados con los polimorfismos de ADN y los caracteres que representan obstáculos para la producción de papa	CIP
Mapeo de resistencias a enfermedades bacterianas y víricas	CIP

Debener, T., F. Salamini y C. Gebhardt. Phylogeny of Wild and Cultivated *Solanum* Species Based on Nuclear Restriction Fragment Length Polymorphisms (RFLPs). TAG (Nueva York) 79:360-368, 1990.

Desborough, Sharon L. y S. J. Peloquin. Potato variety identification by Use of Electrophoretic Patterns of Tuber Proteins and Enzymes. Am. Pot. J. (Orono) 45:200-229, 1968.

Desborough, Sharon L. Potato (*Solanum tuberosum* L.). / Sharon L. Desborough. - En: Isozymes in Plant Genetics and Breeding. - Amsterdam : Elsevier Science Publisher, 1983. - p. 167-188.

Douches, D. S. y C. F. Quiros. Use of 4x-2x Crosses to Determine Gene Centromere Map Distances of Isozyme loci in *Solanum* species. Genome 29:519-527, 1987.

Douches, D. S., K. Ludlam y E. Vargas. Electrophoretic Survey of North American Potato Varieties. American Potato Journal (Orono) 66:518, 1989.

Douches, D. S. Use of RFLPs to Fingerprint North American Potato Cultivars. / D. S. Douches, R. Freyre, K. Hicks. - En Report of Planning Conference on "Application of Molecular Techniques to Potato Germplasm Enhancement" - Lima : CIP, 1991. - p. 166-176.

Emerson, R. A. A Summary of Linkage Studies in Maize. / R. A. Emerson, G. W. Beadle, A. C. Frazer. Cornell : Cornell Univ. Agr. Exp. Stn., 1935.

Ganal, M. W., N. L. V. Lapitan y S. D. Tanksley. A Molecular and Cytogenetic Survey of Major repeated DNA Sequences in Tomato (*Lycopersicon esculentum*). Mol. Gen. Genet. (Nueva York) 213:252-268, 1988.

Gebhardt, C. *et al.* Identification of 2n Breeding lines and 4n Varieties of Potato (*Solanum tuberosum* spp. Tuberosum) with RFLP Fingerprints. TAG (Nueva York) 78:16-22, 1989a.

Gebhardt, C. *et al.* RFLP Analysis and Linkage Mapping in *Solanum tuberosum*. TAG (Nueva York) 78:65-75, 1989b.

Heinhorts, S. *et al.* Clone Bank and Physical and Genetic Map of Potato Chloroplast DNA. TAG (Nueva York) 75:244-251, 1988.

Hetherington, S. E. *et al.* Heat Tolerance and Cold Tolerance of Cultivated Potatoes Measured by Chlorophyll-Fluorescence Method. Planta (Nueva York) 159:119-124, 1983.

Hosaka, K. y R. E. Hanneman. The Origin of The Cultivated Tetraploid Potato Based on Chloroplast DNA. TAG (Nueva York) 76:172-176, 1988.

Hosaka, K. y M. Matsubayashi. Studies on The Phylogenetic Relationships in *Solanum tuberosum* by Isozyme Analysis. 2. Phylogenetic Relationship Between Mexican and South American Diploid Species. Science Reports of Faculty of Agriculture (Kobe) 15:217-228, 1983.

Hosaka, K. y R. E. Hanneman. Seed Protein Variation Within Accessions of Wild and Cultivated Potato Species and Inbred *Solanum chacoense*. Potato Research (Wageningen) 34:419-428, 1991.

Iglesias, Lourdes y R. Rojas. Utilización del Polimorfismo de Longitud de Fragmentos de Restricción (RFLP) en los programas de mejoramiento genético de plantas. Cultivos Tropicales (La Habana) 13(1):74-89, 1992.

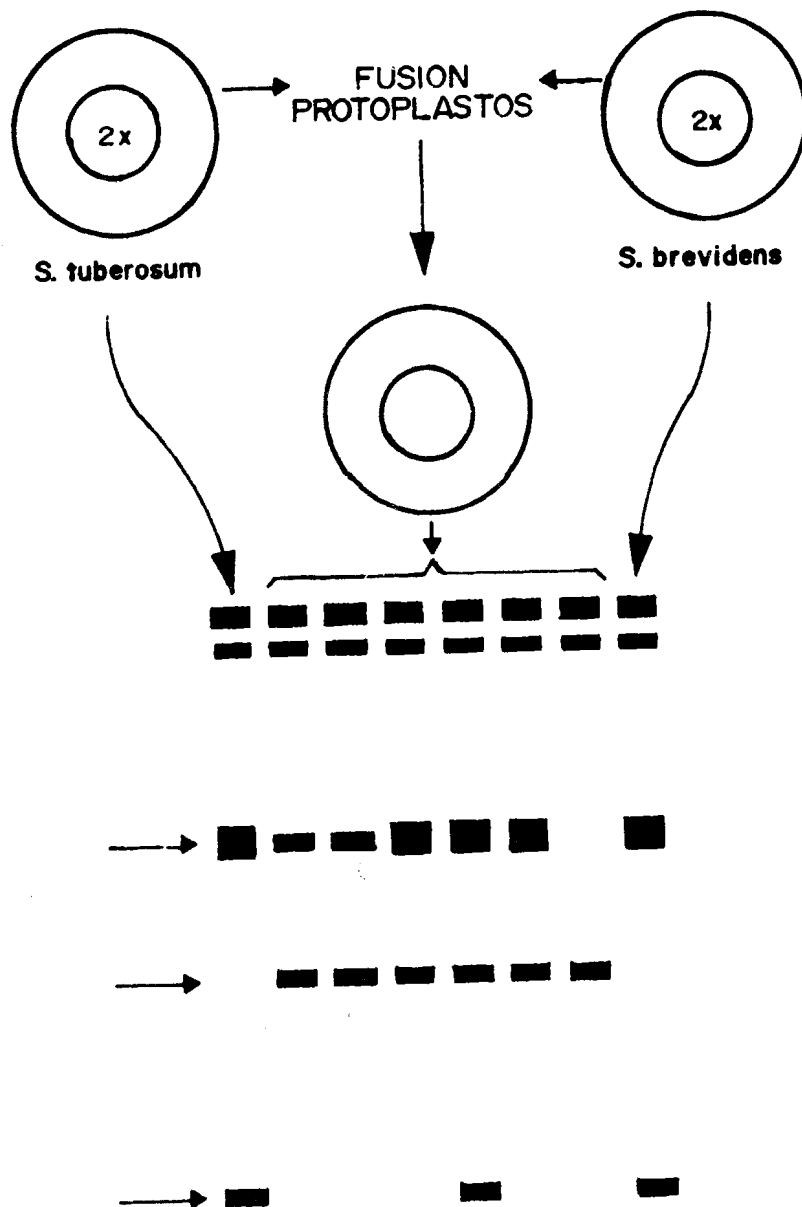


Figura 6. Utilización de marcadores moleculares (cpDNA) para la identificación de híbridos somáticos en papa (Pehu *et al.*, 1989)

Mac Arthur, J. W. Linkage Groups in Tomato. *J. Genet.*(Chappell)29:123-133, 1934.

Mise au point d'une méthode de détermination des variétés par électrophorèse / C. Grison... *et al.*- Documento interno.- Paris : INRA-ITPT, 1979.- 33 p.

Oliver, J. L. y J. M. Martínez-Zapater. Allozyme Variability and Phylogenetic Relationships in The Cultivated Potato (*S. tuberosum*) and Related Species. *Plant Systematics and Evolution* 148:1-18, 1984.

Oliver, J. L. y J. M. Martínez-Zapater. A Genetic Classification of Potato Cultivars Based on Allozyme Patterns. *TAG* (Nueva York)66:305-311, 1985.

Pehu, E. *et al.* Molecular Cytogenetic and Morphological Characterization of Somatic Hybrids of Dihaploid *Solanum tuberosum* and Diploid *S. brevifolium* *TAG* (Nueva York)78:696-704, 1989.

Rickerman, V. S. y S. L. Desborough. Elucidation of The Evolution and Taxonomy of Cultivated Potatoes With Electrophoresis 1. Groups Tuberosum, Andigena, Phureja and Stenotomum. *TAG* (Nueva York)52:217-220, 1978.

Schweizer, G. *et al.* Species-Specific DNA Sequences For Identification of Somatic Hybrids Between *Lycopersicon esculentum* and *Solanum esculentum* *TAG* (Nueva York)75:679-684, 1988.

Smilie, R.M. *et al.* Tolerance of Wild Potato Species From Different Altitudes to Cold and Heat. *Planta* (Nueva York)159:112-118, 1983.

Species-Specific DNA Probes in Introgression Breeding of Potato / C. Brown. *et al.*- En: Report of Planning Conference on "Application of Molecular Techniques to Potato Germplasm Enhancement".- Lima : CIP, 1991.- p. 160-165

GENERACION

PROCEDIMIENTO DE MEJORAMIENTO

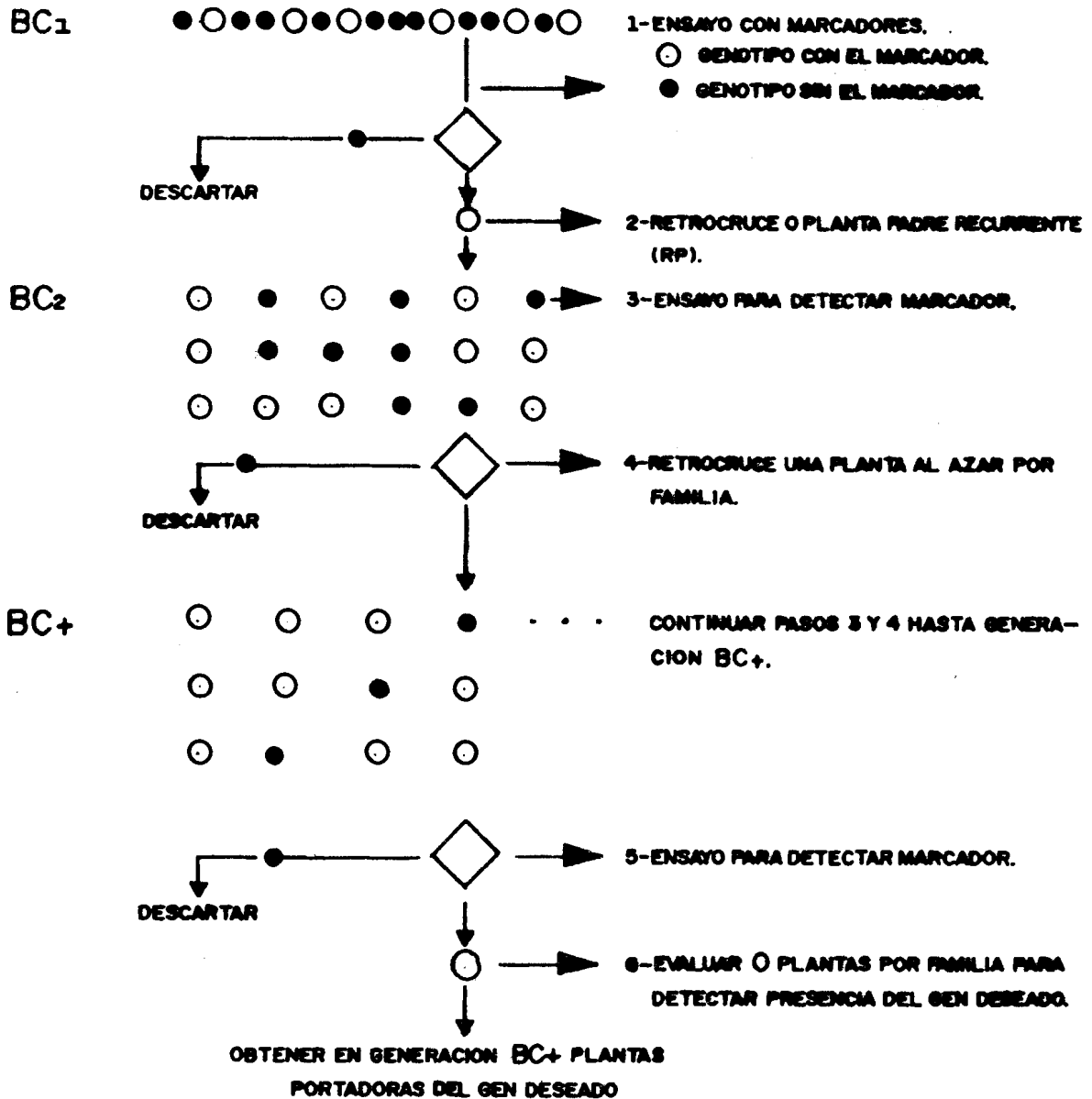


Figura 7. Diagrama de un proceso de selección asistido por marcadores de caracteres monogénicos (o) QTL en un programa de retrocruzamiento

- Stegemann, H. y V. Loeschke. Index of European Potato Varieties Based on Electrophoretic Spectra. *Mitteilungen Forstwirtschaft (Berlin)* 168:1-215, 1978.

Soller, M. y J. S. Beckmann. Molecular Markers in Plant Breeding. *Plant Mol. Biol. Rep. (Berlin)* 1:3-8, 1983.

Watanabe, K. y J. H. Dodds. Cartografía de genes para el mejoramiento genético de la papa. *CIP Circular (Lima)* 18(2):1-5, 1991.

Zamir, D. y S. D. Tanksley. Tomato Genome is Comprised Largely of Fast Evolving Low Copy-Number Sequences. *Mol. Gene. Genet. (Nueva York)* 213:254-261, 1986.

Zhacarius, R. M., S. Krulic y W. Porter. Concerning The Constancy of The Protein Electrophoretic Pattern of a Potato Tuber Variety. *Am. J. Bot. (Nueva York)* 48:57-63, 1971.

Zwartz, J. A. Potato Varieties and Their Protein Electropherogram Characteristics. *Amer. Potato J. (Orono)* 9(2):111-126, 1966.

Recibido: 24 de enero de 1994
 Aceptado: 18 de marzo de 1994