

## ANÁLISIS DE SEGREGANTES AGRUPADOS (BSA) PARA LA DETECCIÓN DE AFLPS LIGADOS AL GEN DE RESISTENCIA A PVX EN *Solanum commersonii*<sup>1</sup>

Mónica Blanco\*, Roberto Valverde<sup>2/\*</sup>

**Palabras clave:** *Solanum commersonii*, Virus X de la papa (PVX), BSA, AFLP.  
**Keywords:** *Solanum commersonii*, Potato virus X (PVX), BSA, AFLP.

Recibido: 16/05/05

Aceptado: 14/07/05

### RESUMEN

Para identificar polimorfismos asociados al gen de resistencia al PVX en la papa silvestre *Solanum commersonii*, se realizó un análisis de segregantes agrupados (BSA) asistido con AFLPs. Estos polimorfismos están basados en la localización de un locus relacionado con la resistencia al virus X de la papa (PVX). Inicialmente, mediante un análisis de ELISA, los individuos de una progenie F<sub>2</sub> previamente inoculados con el PVX, fueron ubicados en 2 grupos, uno con los individuos resistentes y otro con los susceptibles. Posteriormente, para el BSA el ADN de todos los individuos resistentes fue mezclado, lo mismo el ADN de todos los individuos susceptibles. Ambos grupos de ADN fueron analizados independientemente, utilizando 64 diferentes combinaciones de AFLPs. El análisis de los geles resultó en la identificación de 22 combinaciones diferentes de AFLPs que generaron bandas relacionadas exclusivamente con el carácter de resistencia al PVX.

### INTRODUCCIÓN

Los virus constituyen un problema muy serio en una gran cantidad de cultivos, causan pérdidas cuantiosas a los productores y en última instancia a la economía de los países.

### ABSTRACT

**Bulk segregant analysis (BSA) for the detection of AFLPs linked to the PVX resistance gene in *Solanum commersonii*.** The Bulk Segregant Analysis (BSA), in combination with AFLP molecular markers, allowed the identification of DNA polymorphisms in the wild potato *Solanum commersonii* associated to the resistance gene of the Potato Virus X (PVX). Initially, the F<sub>2</sub> individuals were divided in 2 groups, by the means of an ELISA test, one group formed with the resistant individuals and another with the susceptible ones. Later, for the BSA, the mix of DNA from all resistant individuals in one side, and the DNAs from all susceptible ones on the other, were independently analyzed using 64 different primer combinations. By analyzing the bands obtained, 22 different primer combinations yielded AFLPs related to the PVX resistance trait.

En el género *Solanum* se conoce aproximadamente 25 virus y viroides diferentes, que infectan el cultivo en condiciones naturales. Entre los virus de mayor importancia se encuentran el virus del enrollamiento de la hoja (PLRV), el virus del mosaico rugoso (PVY),

1/ Este trabajo forma parte de la tesis de M.Sc. de la autora. Programa de Estudios de Posgrado en Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales. Facultad de Ciencias Agroalimentarias. Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica.

2/ Autor para correspondencia. Correo electrónico: robertov@cariari.ucr.ac.cr

\* Centro de Investigaciones Agronómicas, Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica.

el *virus del mosaico latente* (PVX) y viroides como el del tubérculo ahusado de la papa (PSTV) (Estrada 2000, CIP 1997, Valkonen *et al.* 1996, Hooker 1986).

En Costa Rica, Brenes *et al.* (2002) informan acerca de la presencia de 13 virus (PVY, PVA, PLRV, PMTV, PVS, PVV, APMoV, PAMV, PVM, PVT, AMV, PVX, TRSV) y un viroide (PsTVd) en las plantaciones de las zonas paperas.

De los virus antes mencionados, el PVX posee una alta infectividad, debido a su sistema de transmisión. Este se puede transmitir en forma mecánica, por contacto foliar y a través del material de propagación (Brenes *et al.* 2002, Tommiska *et al.* 1998, Salazar 1995).

Para contrarrestar la presencia de los patógenos, las plantas presentan diferentes sistemas de defensa. En papa la inmunidad o resistencia extrema al PVX fue reportada inicialmente por Schultz y Raleigh (1933) y Schultz *et al.* (1934) según Querci *et al.* (1995). Esta resistencia está basada en un gen dominante designado *Rx*, aislado inicialmente en Chile en *Solanum tuberosum* subsp. *tuberosum* var. Villaroela (Estrada 2000, Brigneti *et al.* 1997, Querci *et al.* 1995, Ritter *et al.* 1991, Cockerham 1970).

Las razas de PVX han sido clasificadas en 2 grupos, dependiendo del tipo de reacción que inducen en la planta: 1. Hipersensibilidad y 2. Resistencia extrema. En el primer grupo, los genes inducen una reacción en la cual el área de infección es delimitada por tejido necrótico. En este grupo se encuentran 2 genes denominados  $N_b$  y  $N_x$  (Zaitlin y Palukaitis 2000, Querci *et al.* 1995). En el segundo grupo, los genes no inducen una respuesta sintomática en la planta, ya que actúan principalmente mediante un mecanismo que suprime o desestabiliza la replicación del virus o que promueve la degradación del ARN viral. En este grupo han sido reportados 2 genes: el  $Rx_{adg}$ , proveniente de *S. andigena* y el  $Rx_{acl}$  que proviene de *S. acaule* (Bendahmane *et al.* 1999, Brigneti *et al.* 1997, Bendahmane *et al.* 1995, Goulden *et al.* 1993, Kohm *et al.* 1993, Wilson 1993, Ritter *et al.* 1991, Cockerham 1970). La raza de PVX<sub>MS</sub> ha sido ligada con la activación de los genes *Rx*, pero es su habilidad

de contrarrestar la resistencia de éstos lo que la convierte en una raza sumamente virulenta (Feigelstock *et al.* 1995).

El aislamiento de los genes de resistencia, como los antes mencionados, ha sido posible, entre otras técnicas, con el uso de marcadores moleculares, entre estos se encuentran los Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) (Vos *et al.* 1995). Esta técnica está basada en la utilización de la Polymerase Chain Reaction (PCR) (Williams *et al.* 1990, Kim *et al.* 1998), donde la búsqueda de polimorfismos a lo largo del genoma de los individuos estudiados, ocurre mediante la amplificación selectiva de fragmentos de restricción. La técnica es muy sensible y permite la localización de un número alto de marcadores genéticos, que pueden ser identificados rápidamente y a un costo relativamente bajo. Sin embargo, a la hora de analizar poblaciones grandes la técnica se puede volver tediosa y lenta. De allí que la combinación de técnicas como el BSA con los AFLPs es una herramienta útil en el mejoramiento genético asistido por marcadores moleculares.

El análisis de segregantes agrupados (Bulked Segregant Analysis o BSA) fue desarrollado por Michelmore *et al.* (1991) con RAPDs en lechuga (*Lactuca* spp.). Esta técnica ha sido utilizada para la identificación de marcadores moleculares ligados a un carácter monogénico, dominante o recesivo. El método consiste en comparar 2 grupos de muestras de ADN de individuos pertenecientes a una población segregante. En cada grupo fenotípico los individuos son idénticos para un carácter o gen de interés pero no para otros genes. Dos grupos contrastantes para un carácter, *i.e.* resistencia o susceptibilidad a una enfermedad en particular, son analizados para identificar marcadores que los caractericen. Los marcadores ligados al locus que determina el carácter de interés son polimórficos, mientras que el resto de las bandas son monomórficas (Pelman 1999, Li *et al.* 1998).

La técnica del BSA ha sido ventajosa en una serie de estudios relacionados con el uso de marcadores moleculares. Mediante esta técnica ha sido posible identificar marcadores asociados

a genes de resistencia a PVX en *Solanum phureja* (Tommiska *et al.* 1998, De Jong *et al.* 1997), a PVY y PVA en *S. tuberosum* subsp. *andigena* (Hamalainen *et al.* 1998, Hamalainen *et al.* 1997), a el virus TYLCV en tomate (Chagué *et al.* 1997), a mildew en cebada (Xu y Kasha 2000), a *Phytophthora infestans* en papa (Li *et al.* 1998), a *Fusarium graminearum* en maíz (Bai *et al.* 1999). En el caso de la enfermedad conocida como tizón de las avellanas, con el uso del BSA, los procesos tendientes al mejoramiento genético de esta especie han sido reducidos hasta en 5 años (Davis 1998).

El objetivo de este estudio, fue la localización de AFLPs ligados al carácter de resistencia al PVX mediante un análisis de segregantes agrupados o BSA.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material vegetal

El estudio se realizó en 26 plantas F<sub>2</sub>, provenientes del cruce entre 2 individuos denominados 78.7 y 2100, ambos heterocigotos y resistentes al PVX<sub>MS</sub> de la papa; que a su vez eran producto del cruce entre 2 progenitores silvestres de *Solanum commersonii*. Tanto la población F<sub>1</sub> como la F<sub>2</sub> fueron producidas por el INTA (Instituto Nacional de Tecnología Agrícola) de Argentina.

### Raza viral utilizada para evaluar la resistencia

Para evaluar la resistencia o susceptibilidad de los individuos de la progenie (F<sub>2</sub>), estos individuos fueron inoculados con la raza viral PVX<sub>MS</sub>, la cual fue aislada de plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) de la variedad Xanthi.

### Inoculación de las plantas

Hojas de tabaco (*Nicotiana* sp.) infectadas con el PVX fueron homogeneizadas en un buffer fosfato 0,1 M (pH 8,0) en una relación

de 1:2 (peso:volumen) (Russo *et al.* 1998). El extracto obtenido fue aplicado a las hojas de los padres y la progenie, ubicadas en la parte media de las plantas, con el uso de un material abrasivo. Las plantas fueron mantenidas en un invernadero libre de insectos y con una temperatura de 22 a 25°C.

### ELISA

Para corroborar el fenotipo de los progenitores y establecer el de la F<sub>2</sub> (resistencia o susceptibilidad) 30 días después de la inoculación con el virus se realizó un análisis inmunológico denominado ELISA doble-sandwich (DAS-ELISA) (CIP 1997, Ausubel *et al.* 1995, Sánchez y Cambra 1987). La infección se cuantificó utilizando anticuerpo anti PVX conjugado con fosfatasa alcalina de un kit comercial (Enzyme immunoassay for the *in vitro* detection of potato virus X, Boehringer Mannheim, Alemania), el cual una vez agregado al sustrato presentó un producto de reacción coloreado en los casos en que había presencia de virus en la planta.

Con el uso de un espectrofotómetro de 8 canales automático (Titertek Multiscan MC, Flow Laboratory) calibrado a 405 nm y los controles positivo y negativo fue posible cuantificar la presencia del virus en las muestras.

### Extracción de ADN

El ADN genómico de las plantas de papa se extrajo mediante el método CTAB modificado por Maroof *et al.* (1984) (citado en Hoisington *et al.* 1994). Este consistió en pulverizar hojas frescas con nitrógeno líquido en un mortero. El macerado se incubó en buffer CTAB durante 60 a 90 min. a 65°C. Luego fue tratado con cloroformo:octanol (24:1 v/v) y el ADN fue precipitado con isopropanol. El ADN fue cuantificado mediante espectrofotometría ultravioleta.

### BSA

Una vez extraído el ADN, la concentración de cada muestra se uniformó a 450 ng µl<sup>-1</sup>, de los

cuales se tomó 5 µl de cada uno de los individuos resistentes y se mezcló, igual se hizo para cada uno de los individuos susceptibles (Micheltore *et al.* 1991, Hamalainen *et al.* 1998, Tommiska *et al.* 1998). De esta forma fueron preparados los 2 grupos para realizar un análisis con los marcadores moleculares AFLPs y así poder identificar polimorfismos, en el patrón de bandas, ligados exclusivamente al gen de resistencia.

### Análisis mediante AFLP

La técnica de AFLP fue realizada según el protocolo "AFLP Started Primer Kit" y "AFLP Analysis System I" proveniente de Gibco BRL (Eggenheim, Alemania) y siguiendo las recomendaciones dadas por Vos *et al.* (1995). Muestras de ADN genómico de 450 ng µl<sup>-1</sup> fueron digeridas con las enzimas *EcoRI* y *MseI* (1U de cada una) en un volumen de 12,5 µl durante 3 horas a 37°C. Luego se incubó la mezcla por 15 min. a 70°C para inactivar las enzimas. Posteriormente se realizó la ligación de los adaptadores *EcoRI* (5'-AATTGGTACGCAGTCTACCTCGTAGA CTGCGTACC-3') y *MseI* (5'-TACTCAGGACTC ATGACGATGAGTCCTGAG-3') en un volumen de 12,5 µl de solución adaptador/ligador, durante 2 horas a temperatura ambiente. Seguidamente se hizo una dilución 1:10 del producto de la ligación con buffer TE (10 mM Tris-HCl, pH 8,0; 0,1 mM EDTA); de la que se tomó 2,5 µl para preparar 25 µl de la mezcla de pre-amplificación (imprimadores, buffer 10X con Mg y la *Taq* polimerasa). La pre-amplificación consistió de 20 ciclos de: desnaturalización por 30s a 94°C, hibridación por 60s a 56°C y extensión final por 60s a 72°C. Con el producto de la pre-amplificación se hizo una nueva dilución 1:5 con TE, de la que se tomó 2,5 µl para preparar 10 µl de mezcla para la amplificación selectiva de los fragmentos pre-amplificados; en este paso se usó un par de imprimadores, cada uno con 3 nucleótidos selectivos en el extremo 3'. El programa de PCR para esta etapa fue de: 1 ciclo inicial de desnaturalización por 30s a 94°C, hibridación por 30s a 65°C y extensión por 60s a 72°C; seguido por 12 ciclos en los cuales la temperatura de hibridación disminuyó 0,7°C en

cada ciclo. Finalmente se realizó 23 ciclos de desnaturalización por 30s a 94°C, de hibridación por 30s a 56°C y de extensión por 60s a 72°C. Para todas las reacciones de amplificación se utilizó un termociclador "PCR System 9700" (PE Applied Bio System, USA). Para el análisis con los marcadores AFLPs se utilizó 64 combinaciones de imprimadores (GIBCO BRL, "AFLP Analysis System I"). Estos provenían de los imprimadores *EcoRI* (5'-GACTGCGTACCAATTC-nucleótidos específicos-3') con 8 diferentes grupos de nucleótidos específicos (E-AAC, E-AAG, E-ACA, E-ACT, E-ACC, E-ACG, E-AGC, E-AGG) y *MseI* (5'-GATGAGTCCTGAGTAA-nucleótidos específicos-3') también con 8 diferentes grupos de nucleótidos específicos (M-CAA, M-CAC, M-CAG, M-CAT, M-CTA, M-CTC, M-CTG, M-CTT) (Cuadro 1).

### Electroforesis y visualización

A 10 µl de producto de amplificación se le agregó un volumen igual de loading buffer (10 mM EDTA, 98% formamida, 0,05% azul de bromofenol y 0,05% xylene cyanole). Cada una de las muestras fue desnaturalizada por 3 min. a 90°C y depositada rápidamente en hielo. Se colocó 6 µl de cada muestra en un gel de acrilamida al 5% y urea 7M. La electroforesis se realizó a 55 W hasta que el frente de xylene cyanole alcanzara el final del gel.

La visualización del gel se realizó mediante tinción con nitrato de plata según las indicaciones del proveedor (Promega, USA) con algunas modificaciones para reducir la coloración de fondo e incrementar la sensibilidad del gel.

Todos los pasos, desde la mezcla de ADN hasta la electroforesis, fueron realizados por duplicado para asegurar la fidelidad del patrón de ADN generado.

### Análisis de resultados

Para el análisis de las bandas se consideró principalmente aquellas localizadas entre los 100 y los 500 pb. Las bandas ubicadas en el grupo con fenotipo resistente se tomaron como base para la

Cuadro 1. Combinaciones de imprimadores para el análisis de la población 2100-78,7.

Combinación de imprimadores	<i>EcoRI</i> (5'→3')	<i>MseI</i> (5'→3')	Combinación de imprimadores	<i>EcoRI</i> (5'→3')	<i>MseI</i> (5'→3')	Combinación de imprimadores	<i>EcoRI</i> (5'→3')	<i>MseI</i> (5'→3')
AFLP1	AAC	CAA	AFLP23	ACA	CTG	AFLP45	ACT	CTA
AFLP2	AAC	CAC	AFLP24	ACA	CTT	AFLP46	ACT	CTC
AFLP3	AAC	CAG	AFLP25	ACC	CAA	AFLP47	ACT	CTG
AFLP4	AAC	CAT	AFLP26	ACC	CAC	AFLP48	ACT	CTT
AFLP5	AAC	CTA	AFLP27	ACC	CAG	AFLP49	AGC	CAA
AFLP6	AAC	CTC	AFLP28	ACC	CAT	AFLP50	AGC	CAC
AFLP7	AAC	CTG	AFLP29	ACC	CTA	AFLP51	AGC	CAG
AFLP8	AAC	CTT	AFLP30	ACC	CTC	AFLP52	AGC	CAT
AFLP9	AAG	CAA	AFLP31	ACC	CTG	AFLP53	AGC	CTA
AFLP10	AAG	CAC	AFLP32	ACC	CTT	AFLP54	AGC	CTC
AFLP11	AAG	CAG	AFLP33	ACG	CAA	AFLP55	AGC	CTG
AFLP12	AAG	CAT	AFLP34	ACG	CAC	AFLP56	AGC	CTT
AFLP13	AAG	CTA	AFLP35	ACG	CAG	AFLP57	AGG	CAA
AFLP14	AAG	CTC	AFLP36	ACG	CAT	AFLP58	AGG	CAC
AFLP15	AAG	CTG	AFLP37	ACG	CTA	AFLP59	AGG	CAG
AFLP16	AAG	CTT	AFLP38	ACG	CTC	AFLP60	AGG	CAT
AFLP17	ACA	CAA	AFLP39	ACG	CTG	AFLP61	AGG	CTA
AFLP18	ACA	CAC	AFLP40	ACG	CTT	AFLP62	AGG	CTC
AFLP19	ACA	CAG	AFLP41	ACT	CAA	AFLP63	AGG	CTG
AFLP20	ACA	CAT	AFLP42	ACT	CAC	AFLP64	AGG	CTT
AFLP21	ACA	CTA	AFLP43	ACT	CAG			
AFLP22	ACA	CTC	AFLP44	ACT	CAT			

caracterización molecular de los 2 fenotipos de interés. Para cada combinación de imprimadores se estableció la cantidad de bandas polimórficas en los 2 grupos y el porcentaje de éstas en cada combinación. En cada una de las combinaciones analizadas se tomó como polimorfismo cualquier banda que fuera diferente con respecto al grupo resistente aunque ésta representara un bajo porcentaje del total de las bandas observadas.

## RESULTADOS

### Evaluación del material inoculado con el PVX<sub>MS</sub>

A los 30 días de la inoculación de las plantas con el PVX, estas no presentaban clorosis, necrosis o un mosaico leve o severo; síntomas observados por la infección con PVX (Hord y

Rivera 1998, CIP 1997, FAO 1995, Feigelstock *et al.* 1995, Goulden *et al.* 1993). Sin embargo, una vez que se realizó la prueba de ELISA se determinó que de los 26 individuos que forman la progenie, 7 resultaron positivos respecto a la presencia del virus, lo que indica que son susceptibles y 19 negativos, indicativo de que son resistentes al PVX. Así mismo, se comprobó que ambos padres (78,7 y 2100) son resistentes al PVX<sub>MS</sub>. El análisis de los resultados del ELISA en la progenie mediante la prueba de Chi-cuadrado indicó que existe un 88,75% de probabilidad de que la segregación para el carácter de resistencia a PVX<sub>MS</sub> se ajuste a la proporción fenotípica 3:1. Estos resultados ponen de manifiesto el estado heterocigoto de ambos padres y la naturaleza monogénica de la resistencia en estudio.

#### Composición de los grupos segregantes

Con los resultados obtenidos en la prueba de ELISA se procedió a reunir el ADN de los individuos segregantes en 2 grupos contrastantes para el carácter de resistencia a PVX<sub>MS</sub>, uno formado por los 19 individuos resistentes y el otro formado por los 7 individuos susceptibles. La evaluación independiente del ADN de ambos grupos, al aplicar la estrategia de análisis de

segregantes agrupados (Michelmore *et al.* 1991, Tabor *et al.* 2000), permitió identificar en un corto plazo marcadores moleculares ligados a un gen o región específica del genoma.

#### Identificación de marcadores polimórficos mediante BSA

A partir de la mezcla del ADN de los individuos resistentes y de los susceptibles, se pudo generar un perfil para los AFLP de los 2 grupos, usando las 64 combinaciones de imprimadores *EcoRI/MseI*. Se encontró 3 tipos diferentes de patrones de bandas (Figura 1): en el primer caso, bandas ligadas directamente al carácter de resistencia, o sea, las bandas estaban presentes en el grupo de los individuos provenientes de plantas resistentes y ausentes en el grupo de los individuos susceptibles. Estas bandas fueron seleccionadas como informativas para el posterior análisis de la progenie (Figura 1a). En el segundo caso no se encontró ninguna banda polimórfica de importancia ligada específicamente a alguno de los caracteres estudiados (Figura 1b) y el patrón de bandas fue igual para ambos grupos. Estas combinaciones de imprimadores no se consideraron informativas para el análisis total de la progenie. En el tercer caso, se encontró

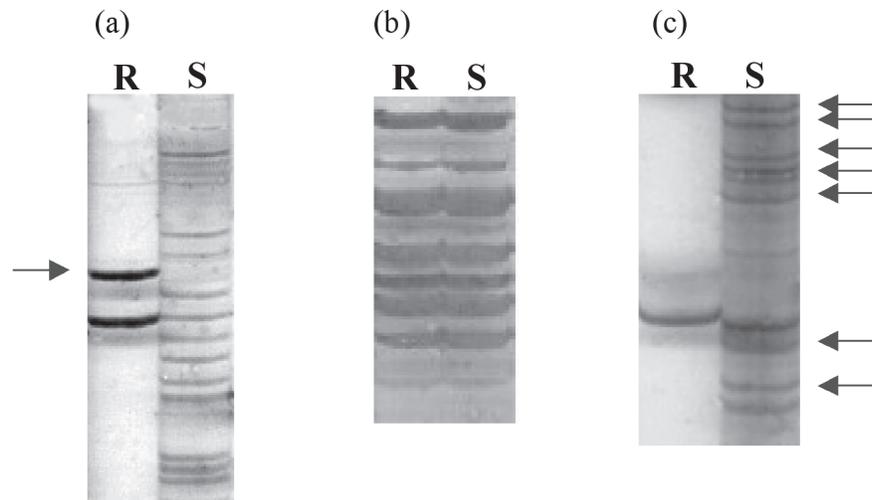


Fig. 1. Patrón de bandas encontrado mediante el BSA en plantas de *S. commersonii*.

bandas ligadas únicamente al grupo de los individuos susceptibles, pero que no estaban ligadas al carácter de interés, la resistencia (Figura 1c).

El número de fragmentos amplificados fue en promedio de 35 bandas por combinación de imprimador, con un tamaño entre los 100-500 pb (Figura 2).

Considerando cada fragmento de AFLP como un locus -sin tener en cuenta posibles alelismos entre diferentes fragmentos- se analizó aproximadamente 2290 loci. Los patrones de bandas de AFLP mostraron, en forma consistente, ser altamente reproducibles.

De las 64 combinaciones de imprimadores analizadas, 22 (un 34,4%) mostraron bandas polimórficas nítidas entre ambos grupos (Figura 2). En total se encontró 247 bandas polimórficas, las cuales representan un 10,77% del total de loci analizados. De estas 247 bandas un 6,32% está ligado al carácter de resistencia y un 5,06% al carácter de susceptibilidad, mientras que el resto de las bandas está ligado a ambos grupos.

De las 22 combinaciones de imprimadores seleccionadas a partir del BSA, se observó que los *EcoRI*, con las terminaciones ACA y AGC estuvieron representadas en un 22,7 y un 18,1% de las combinaciones, respectivamente. Mientras

que en los imprimadores *MseI*, la terminación CAG estuvo representada en un 22,7% de las combinaciones.

## DISCUSIÓN

### Evaluación de la población inoculada

Una vez inoculado el material con el virus y después de 30 días no se observó ningún signo visible de infección en las plantas. Esto nos condujo a pensar que los síntomas foliares, en este caso, no eran indicadores confiables para asignar el carácter de resistencia o susceptibilidad en las plantas. De esta forma, se decidió realizar el ELISA, con el fin de determinar si la ausencia de sintomatología se debía a la ausencia del virus o al tipo de respuesta de la planta.

Los resultados del ELISA mostraron, que aún cuando no se observó ninguna sintomatología en las plantas inoculadas con el virus, algunas de las plantas si estaban infectadas. En este caso el ELISA viene a indicar que *S. commersonii* podría ser una especie con resistencia extrema al PVX. Esta característica de *S. commersonii* cobra más importancia si se considera que dicho tipo de

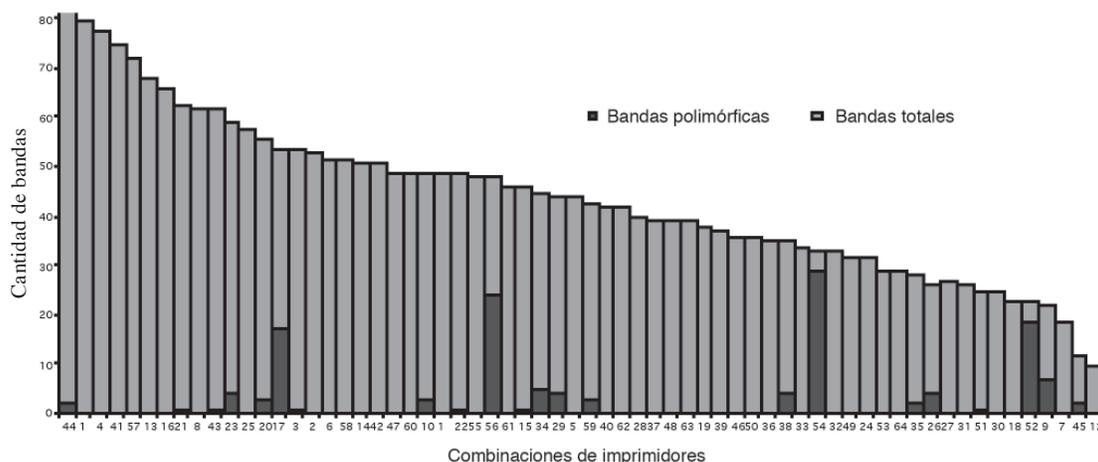


Fig. 2. Total de imprimadores utilizados y polimorfismos encontrados con el BSA. Cada combinación fue generada mediante los imprimadores *EcoRI* y *MseI* portadores de una secuencia de 3 nucleótidos específicos. La numeración corresponde al número específico de imprimador indicado en el cuadro 1.

resistencia no ha sido documentado ampliamente en esta especie de *Solanum* y que las plantas fueron inoculadas con la raza PVX<sub>MS</sub>, la cual según Feigelstock *et al.* (1995) en algunos casos ha logrado contrarrestar la resistencia extrema en plantas de papa.

En el caso de las plantas de *S. comersonii* que lograron contrarrestar el ataque del virus PVX<sub>MS</sub>, se supone que tienen genes *Rx* que podrían ser evaluados posteriormente mediante el análisis de la progenie con marcadores moleculares de interés.

### **Análisis fenotípico**

La categorización fenotípica de los individuos pertenecientes a la población de *S. comersonii* en resistentes y susceptibles se facilitó por la disponibilidad de una metodología sencilla, segura y eficiente como es la detección inmunológica, mediante el análisis ELISA. Esta técnica es utilizada como método de diagnóstico de infecciones por diversos patógenos (Theilmann *et al.* 2002, Oruetxebarria *et al.* 2000, Terrada *et al.* 2000, Davis 1998, Rajamaki *et al.* 1998, Santa Cruz y Baulcombe 1993), en nuestro caso fue utilizada para determinar la presencia o ausencia del PVX en plantas inoculadas. Con esa metodología se identificó las plantas pertenecientes a la progenie en estudio que presentaban resistencia o susceptibilidad a la infección por la raza MS, que es una de las más virulentas dentro del grupo de los PVX (Feigelstock *et al.* 1995). Cabe destacar, que esta resistencia se dio en la mayoría de los individuos de la progenie, aún cuando la infección se realizó con gran cantidad de inóculo viral.

### **Segregación de la resistencia al PVX<sub>MS</sub>**

El análisis de segregación se ajustó a una proporción 3:1, lo que indica que la resistencia al PVX<sub>MS</sub> es controlada por un único gen y que ambos padres son heterocigotas. Estos resultados coinciden con los trabajos de Valkonen *et al.* (1996) y Ritter *et al.* (1991), quienes indican que la resistencia extrema es de origen monogénico. Esto haría sumamente atractivo el hallazgo de

marcadores, que estén estrechamente ligados a la resistencia en estudio, pues permitiría a los programas de mejoramiento genético asistidos por marcadores, realizar más rápidamente la transferencia de genes entre variedades, así como la introgresión de genes nuevos provenientes de especies silvestres.

Utilizar una población segregante para el estudio, proveniente de padres heterocigotos, hace que la progenie esté conformada por individuos altamente variables. De esta forma, el grupo de individuos resistentes se formó con ADN tanto de individuos heterocigotas como homocigotas y el grupo de susceptibles con individuos homocigotas. Esto tiene la ventaja de una mayor cantidad de segmentos donde se puede encontrar marcadores ligados al locus de interés (Michelmore *et al.* 1991). Se pudo observar que cualquier banda presente en el grupo resistente y ausente en el grupo susceptible, estaría necesariamente ligada con el carácter de resistencia buscado. Por otra parte, bandas en loci no relacionadas con el locus *R<sub>x</sub>* podían aparecer en ambos grupos resistente o susceptible.

### **Análisis de segregantes agrupados (BSA) con marcadores AFLP**

Los resultados obtenidos con el BSA en este estudio, son un indicativo de la eficiencia de esta técnica en la identificación de polimorfismos específicos, relacionados con el gen de interés. Esta ventaja del BSA ha sido utilizada en múltiples trabajos, donde sobresale la utilización de diferentes marcadores moleculares; ejemplos de estos trabajos son las investigaciones de Rajesh *et al.* (2002) para la localización de RGAs en garbanzo, de Dulson *et al.* (1998) para RAPDs en *Brassica napus*, de Hamalainen *et al.* (1997) con RFLPs para la determinación de un gen de resistencia relacionado con el Virus Y de papa y de Li *et al.* (1998) en papa con AFLPs para determinar el alelo *R2* que confiere resistencia a *Phytophthora infestans*. Estos trabajos, ponen de manifiesto que para una utilización efectiva del BSA el único requisito es la existencia de una población que segregue para un gen de interés (Michelmore *et al.* 1991).

Dentro del grupo de imprimadores utilizados para los AFLPs, las terminaciones ACA y AGC del *EcoRI* y CAG del *MseI*, fueron las que conformaron la mayor cantidad de combinaciones. Estas son consideradas altamente informativas, pues son un indicativo de que son comunes en el genoma de *S. commersonii*. Esta característica las convierte en secuencias de gran valor para la confección de otros imprimadores, que generen polimorfismos tanto para la creación de mapas de ligamiento como para mapas físicos.

En resumen, el BSA permitió seleccionar una serie de AFLPs relacionados con el gen de resistencia al PVX en *S. commersonii*. Los AFLPs identificados son el producto de una metodología, el BSA, que se puede aplicar con rapidez y facilidad para el estudio de poblaciones ligadas a un carácter monogénico, que permite analizar poblaciones muy grandes o seleccionar imprimadores de interés a partir de una gran cantidad de ellos; y facilita enfocarse en regiones de interés a la hora de analizar una progenie. Estas ventajas hacen del BSA una de las herramientas más utilizadas hoy día en los programas de mejoramiento genético asistido con marcadores moleculares.

### AGRADECIMIENTO

Este trabajo fue financiado por la Comisión Europea en el marco del proyecto INCO-PL ICA4-CT-2000-30008. "Resistance wild potato as a source for novel genes mediating resistance against fungal, viral and nematode diseases".

### LITERATURA CITADA

- AUSUBEL F., BRENT R., KINGSTON R., MOORE D., SEIDMAN J.G., SMITH J., STRUHL K. 1995. Current protocols in molecular biology. Vol II. John Wiley and Sons, Inc., USA p. 11.0.3-11.2.21.
- BAIG., KOLBF., SHANER G., DOMIER L. 1999. Amplified fragment length polymorphism markers linked to a major quantitative trait locus controlling scab resistance in wheat. *Phytopathology* 89(4): 343-348.
- BENDAHMANE A., KANYUKA K., BAULCOMBE D.C. 1999. The *Rx* gene from potato controls separate virus resistance and cell death responses. *Plant Cell* 11: 781-791.
- BENDAHMANE A., KOHM B., DEDI C., BAULCOMBE D. 1995. The coat protein of potato virus X is a strain-specific elicitor of *Rx* 1-mediated virus resistance in potato. *The Plant Journal* 8(6): 933-941.
- BRENES A., RIVERA C., VASQUEZ V. 2002. Principales enfermedades y plagas de la papa en Costa Rica. San José, Costa Rica. EUNED. 120 p.
- BRIGNETI G., GARCIA-MAS J., BAULCOMBE D.C. 1997. Molecular mapping of the potato virus Y resistance gene *Ry<sub>sto</sub>* in potato. *Theor. Appl. Genet.* 94: 198-203.
- CHAGUE V., MERCIER J.C., GUENARD M., DE COURCEL A., VEDEL F. 1997. Identification of RAPD markers linked to a locus involved in quantitative resistance to TYLCV in tomato by bulked segregant analysis. *Theor. Appl. Genet.* 95: 671-677.
- CIP. 1997. Características generales de los virus y la importancia de las enfermedades que causan. Barrera C. (ed.). Manual de capacitación. Lima, Perú. Fasc. 3.1: 1-8.
- CIP. 1997. Técnicas en virología de plantas. Salazar L.F. y Jayasinghe U. (eds.). Manual de Capacitación. Lima, Perú. s.p.
- COCKERHAM G. 1970. Genetical studies on resistance to potato viruses X and Y. *Heredity* 25(3): 309-348.
- DAVIS J. 1998. Identification and development of PCR-based markers linked to Eastern Filbert Blight resistance in hazelnut. Thesis Master of Science. Oregon State University, USA 53 p.
- DE JONG W., FORSYTH A., LEISTER D., GEBHARDT C., BAULCOMBE D.C. 1997. A potato hypersensitive resistance gene against virus X maps to a resistance gene cluster on chromosome 5. *Theor. Appl. Genet.* 95: 246-252.
- DULSON J, KOTT L, RIPLEY V. 1998. Efficacy of bulked DNA samples for RAPD DNA fingerprinting of genetically complex *Brassica napus* cultivars. *Euphytica* 102: 65-70.
- ESTRADA N. 2000. La biodiversidad en el mejoramiento genético de la papa. CIP, IPGRI, BARRICA, COSUDE, CID, IBTA, PROINPA, Bolivia. 372 p.
- FAO. 1995. La papa en la década de 1990. Situación y perspectivas de la economía de la papa a nivel

- mundial. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, Italia. 50 p.
- FEIGELSTOCK D., TOZZINI A., HOPP E. 1995. Coat protein sequence of a resistance-breaking strain of potato virus X isolated in Argentina. *Virus Genes* 10(3): 289-292.
- GOULDEN M., KOHM B., SANTA CRUZ S., KAVANAGH T., BAULCOMBE D. 1993. A feature of the coat protein of potato virus X affects both induced virus resistance in potato and viral fitness. *Virology* 197: 293-302.
- HAMALAINEN J.H., SORRI V.A., WATANABE K.N., GEBHARDT C., VALKONEN J.P.T. 1998. Molecular examination of a chromosome region that controls resistance to potato Y and A potyviruses in potato. *Theor. Appl. Genet.* 96: 1036-1043.
- HAMALAINEN J.H., WATANABE K.N., VALKONEN J.P.T., ARIHARA A., PLAISTED R.L., PEHU E., MILLER L., SLACK S.A. 1997. Mapping and marker-assisted selection for a gene for extreme resistance to potato virus Y. *Theor. Appl. Genet.* 94: 192-197.
- HOISINGTON D., KHAIRALLAH M., GONZALEZ DE LEON L. 1994. Laboratory protocols: CIMMYT applied molecular genetics laboratory. 2 ed. Ed. México, D. F.: CIMMYT. 50 p.
- HOOKE W. 1986. Enfermedades virosas de la papa. Montevideo, Hemisferio Sur y Centro Internacional de la Papa. 17 p. (Boletín de Información Técnica 19).
- HORD M., RIVERA C. 1998. Prevalencia y distribución geográfica de los virus PVX, PVY, PVA, PVM, PVS y PLRV en el cultivo de la papa en la zona norte de Cartago, Costa Rica. *Agronomía Costarricense* 22: 137-143.
- KIM J.H., JOUNG H., KIM H.Y., LIM Y.P. 1998. Estimation of genetic variation and relationship in potato (*Solanum tuberosum* L.) cultivars using AFLP markers. *Amer. J. of Potato Res.* 75: 107-112.
- KOHM B., GOULDEN M., GILBERT J., KAVANAGH T., BAULCOMBE D. 1993. A potato virus X resistance gene mediates and induced, nonspecific resistance in protoplast. *Plant Cell* 5: 913-920.
- LI X., VAN ECK H. J., ROUPPE VAN DER VOORT J. N. A. M., HUIGEN D.J., STAM P., JACOBSEN E. 1998. Autotetraploids and genetic mapping using common AFLP markers: the R2 allele conferring resistance to *Phytophthora infestans* mapped on potato chromosome 4. *Theor. Appl. Genet.* 96: 1121-1128.
- MICHELMORE R. W., PARAN I., KESSELI R. V. 1991. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: A rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88: 9828-9832.
- ORUETXEBARRIA I., KEKARAINEN T., SPETZ C., VALKONEN J. 2000. Molecular characterization of Potato virus V genomes from Europe indicates limited spatiotemporal strain differentiation. *Phytopathology* 90(4): 437-444.
- PELEMAN J. 1999. Application of the AFLP technique in marker assisted breeding. <http://webdoc.sub.gwdg.de/ebook/1999/whichmarker/index.htm>
- QUERCI M., BAULCOMBE D.C., GOLDBACH R.W., SALAZAR L.F. 1995. Analysis of the resistance-breaking determinants of potato virus X (PVX) strain HB on different potato genotypes expressing extreme resistance to PVX. *Phytopathology* 85(9): 1003-1010.
- RAJAMAKI M., MERITZ A., RABENSTEIN F., ANDREJEVA J., PAULIN L., TEKARAINEN T., KREUZE J.F., FORSTER R.L.S., VALKONEN J. 1998. Biological, serological and molecular differences among isolates of potato A potyvirus. *Phytopathology* 88(4): 311-321.
- RAJESH P.N., TEKEOGLU M., GUPTA V.S., RANJEKAR P.K., MUEHLBAUER F.J. 2002. Molecular mapping and characterization of an RGA locus RGAPtokin1-2<sub>171</sub> in chickpea. *Euphytica* 128: 427-433.
- RITTER E., DEBENER T, BARONE A, SALAMINI F, GEBHARDT C. 1991. RFLP mapping on potato chromosomes of two genes controlling extreme resistance to potato virus X (PVX). *Mol. Gen. Genet.* 227: 81-85.
- RUSSO P., SLACK D.A. 1998. Tissue culture methods for the screening and analysis of putative virus-resistance transgenic potato plants. *Phytopathology* 88(5): 437-441.
- SALAZAR L. 1995. Los virus de la papa y su control. Centro Internacional de la Papa, Perú. 226 p.

- SÁNCHEZ-VISCAINO J.M., CAMBRA M. 1987. Técnicas inmunoenzimáticas ELISA en patología animal y vegetal. Office International des Epizooties. Francia. p. 1-57.
- SANTA CRUZ B., BAULCOMBE D. 1993. Molecular analysis of potato virus X isolates in relation to the potato hypersensitivity gene *Nx*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 6(6): 707-714.
- TABOR G.M., KUBISIAK T.L., KLOPFENSTEIN N.B., HALL R.B., MCNABB H.S. 2000. Bulked segregant analysis identifies molecular markers linked to *Melampsora medusae* resistance in *Populus deltoides*. *Phytopathology* 90 (9): 1039-1042.
- TERRADA E., KERSCHBAUMER R., GIUNTA G., GALEFFI P., HIMMLER G., CAMBRA M. 2000. Fully "recombinant enzyme-linked immunosorbent assays" using genetically engineered single-chain antibody fusion proteins for detection of *Citrus tristetza* virus. *Phytopathology* 90(12): 1337-1344.
- THEILMANN J., MOZAFARI J., READE R., WU Z., XIE W., JESPERSON G., BERNARDY M., EASTWELL K., ROCHON D. 2002. Partial nucleotide sequence and genome organization of a canadian isolate of *Little cherry virus* and development of an enzyme-linked immunosorbent assay-based diagnostic test. *Phytopathology* 92(1): 87-98.
- TOMMISKA T.J., HAMALAINEN J.H., WATANABE K.N., VALKONEN J.P.T. 1998. Mapping of the gene *Nx<sub>phu</sub>* that controls hypersensitive resistance to potato virus X in *Solanum phureja* IvP35. *Theor. Appl. Genet.* 96: 840-843.
- VALKONEN J.P.T., JONES R.A., SLACK S.A., WATANABE K.N. 1996. Resistance specificities to viruses in potato: standardization of nomenclature. *Plant Breeding* 115: 433-438.
- VOS P., HOGERS R., BLEEKER M., REIJANS M., VAN DE LEE T., HORNES M., FRIJTERS A., POT J., PELEMAN J., KUIPER M., ZABEAU M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* 23(21): 4407-4414.
- WILLIAMS J., KUBELIK A., LIVAK K., RAFALSKI A., TINGEY S. 1990. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* 18(22): 6531-6535.
- WILSON M. 1993. Strategies to protect crop plants against viruses: pathogen-derived resistance blossoms. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90: 3134-3141.
- XU J., KASHA K. 2000. Bulked segregant screening for RAPD markers linked to a disease-resistance gene transferred from *Hordeum bulbosum* into cultivated barley. <http://wheat.pw.usda.gov/ggpages/bgn/21/g21-01.html>
- ZAITLIN M., PALUKAITIS P. 2000. Advances in understanding plant viruses and virus diseases. *Annu. Rev. Phytopathol.* 38: 117-143.