

Identificación de Genes *R1* y *R2* que confieren resistencia a *Phytophthora infestans* en genotipos colombianos de papa

Identification of *R1* and *R2* Genes conferring resistance to *Phytophthora infestans* in Colombian potato genotypes

Marcela Díaz M. *, Diego A. Fajardo **, José Dilmer Moreno * **, Celsa García * ***, Víctor M. Núñez * ****.

RESUMEN

En Colombia, actualmente existen genotipos de papa con excelente calidad industrial pero muy susceptibles a *P. infestans*. La mejor manera de combatir este problema es mediante resistencia genética, puesto que la inversión para controlar esta enfermedad por medios químicos es muy costosa, sin olvidar la contaminación ambiental que producen. El objetivo de este trabajo fue la identificación de genes *R1* y *R2* en los diferenciales de papa respectivos (*Solanum tuberosum* ssp. *tuberosum*) mediante evaluación de resistencia a *P. infestans* y la detección molecular por medio de PCR (alelo *R1*) y AFLP (alelo *R2*). Para la detección del alelo *R1* fueron empleados los primers GP179, GP21, 76-2SF2/76-2SR, SPUD237 y Sol 2749-2770F / Sol 3246-3267R. Los primers GP179, GP21 y SPUD237 fueron inespecíficos para *R1*, ya que se generó un producto de amplificación en los diferenciales 1 y 2, así como también en *Solanum phureja*. Los primers 76-2SF2/76-2SR, y Sol 2749-2770F / Sol 3246-3267R generaron un producto de amplificación en los diferenciales 1 y 2; por el contrario, el fragmento estuvo ausente en el material susceptible. Para la detección del alelo *R2*, fueron implementados cinco marcadores AFLP, de los cuales sólo dos fueron reconocidos visualmente en el diferencial 2. Los resultados mostraron una evidente correspondencia fenotípica y genotípica con respecto a la presencia de los genes *R1* y *R2*. La identificación molecular de genes de resistencia a *P. infestans* permitirá desarrollar programas de mejoramiento genético que beneficien directamente los rendimientos de los cultivos de papa, sobre todo los de mayor interés industrial para nuestro país.

Palabras clave: genes de resistencia, marcadores moleculares, *Phytophthora infestans*, *Solanum tuberosum* ssp. *tuberosum*.

ABSTRACT

Excellent industrial quality potato genotypes are currently available in Colombia; however, they are very susceptible to *P. infestans*. The best way of fighting this problem is by genetic resistance, given that the expense of controlling this disease through chemicals is high, plus the environmental contamination provoked. This work try to identify *R1* and *R2* major genes in respective potato differentials (*Solanum tuberosum* ssp. *tuberosum*) by evaluating *P. infestans* resistance and their molecular detection by PCR (allele *R1*) and AFLP (allele *R2*). GP179, GP21, 76-2SF2/76-2SR, SPUD237 and Sol 2749-2770F/Sol 3246-3267R markers were used for *R1* allele detection. GP179, GP21 and SPUD237 markers were non-specific for *R1* because an amplification product was generated in differentials 1 and 2 as well as *S. phureja*. 76-2SF2/76-2SR and Sol 2749-2770F/Sol 3246-3267R markers created an amplification product in differentials 1 and 2, whilst the fragment was absent in the susceptible material. Five AFLP markers were used for *R2* allele detection; only two of these were visually recognised in differential 2. The

* Bióloga, Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias, Bogotá, Colombia.

** Biólogo, Esp., Corpoica, Programa Nacional de Recursos Genéticos y Biotecnología Vegetal, Tibaitatá.

*** Ingeniero Agrónomo, Ph.D., Corpoica, Programa Agrícola Regional Uno, Tibaitatá.

**** Ingeniera Agrónoma, Ph.D., Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Agronomía, Bogotá, Colombia.

***** Ingeniero Agrónomo, Ph.D., Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (CORPOICA), Programa Nacional de Recursos Genéticos y Biotecnología Vegetal, Tibaitatá, km. 14 vía Mosquera (Cundinamarca), A.A. 240142, Las Palmas, Bogotá, Colombia, e-mail: vnunez@corpoica.org.co

Recibido: Febrero 24 de 2003. **Aceptado:** Julio 15 de 2003.

results showed evident phenotypic and genotypic correspondence respecting *R1* and *R2* gene presence. Molecular identification of *P. infestans* resistant genes will allow breeding programmes to be developed, directly benefiting potato crop yields, above all those having the greatest industrial interest for our country.

Key words: Molecular markers, *Phytophthora infestans*, resistant genes, *Solanum tuberosum* ssp. *tuberosum*

INTRODUCCIÓN

La papa es un producto agrícola de consumo masivo para la población colombiana, especialmente en los estratos con menores ingresos. El consumo de papa en el país se encuentra hoy alrededor de 71 kg/persona/año. Su producción total disponible se destina básicamente a dos usos: el consumo en fresco (80 a 92%) y la industria (7 a 8%) (Carvajal *et al.*, 2000).

La gota, causada por *Phytophthora infestans* Mont. de Bary, produce en América Latina la destrucción o quemazón del follaje y la pudrición seca de los tubérculos de papa (Estrada, 2000; Zapata, 2000). En Colombia, los fungicidas son el principal mecanismo de control de la gota, su inversión representa el 8% de los costos de producción totales (Del Valle, 1997).

El mejoramiento genético, como mecanismo de control de *P. infestans*, está basado en: la *resistencia monogénica* y la *resistencia poligénica*. La resistencia monogénica solamente es efectiva contra ciertas razas del patógeno, controlada por genes dominantes *R*, provenientes de *Solanum demissum* (Malcomson y Black, 1966). En este tipo de resistencia se ha demostrado el concepto *gen por gen* (Agrios, 1996; Flor, 1971; Day, 1974; Vanderplank, 1984; Gebhardt y Valkonen, 2001). La resistencia poligénica es cuantitativa, controlada por muchos genes, cada uno de los cuales puede contribuir en mayor o menor grado a la resistencia (Henfling, 1987; Hardy *et al.*, 1996; Young, 1996; Watanabe y Watanabe 2000).

El propósito de este trabajo fue identificar genes mayores *R1* y *R2* mediante la evaluación de resistencia a *P. infestans* en genotipos colombianos de *Solanum tuberosum* ssp. *tuberosum* y su detección molecular por medio de PCR (alelo *R1*) y AFLP (alelo *R2*). Una vez se tengan identificados los genes que confieren resistencia a *P. infestans* mediante *tecnología molecular*, se podrán integrar los alelos de resistencia a materiales de papa de interés industrial para Colombia por medio de mejoramiento convencional, y de este modo desarrollar estrategias eficientes

en la selección asistida por marcadores encaminadas al mejoramiento genético vegetal (Ribaut y Hoisington, 1998).

MATERIALES Y MÉTODOS

Localización. El presente trabajo se llevó a cabo en el centro de investigaciones Tibaitatá-Corpoica, localizado en el departamento de Cundinamarca, municipio de Mosquera, km 14 de Bogotá, D. C, a una latitud norte de 4° 42' y una longitud oriente de 74° 12'; su altitud de 2543 (msnm). Su clasificación ecológica (Holdridge) es bosque seco Montano Bajo (bs-MB). Este trabajo fue desarrollado en el Laboratorio de Biología Molecular y Biotecnología del Programa Nacional de Recursos Genéticos y Biotecnología Vegetal.

Material vegetal. Se trabajó con 12 reproducciones de la variedad Diacol Monserrate (*Solanum tuberosum* ssp. *andigena*, presenta resistencia poligénica y carece de genes mayores), cinco reproducciones del diferencial 1 (reproducciones de *Solanum tuberosum* ssp. *tuberosum* con gen específico *R1*), siete reproducciones del diferencial 2 (reproducciones de *S. tuberosum* ssp. *tuberosum* con gen específico *R2*). También se trabajó con 75 reproducciones de la variedad Diacol Capiro (material muy susceptible a gota), exclusivamente para la activación de la virulencia de los aislamientos de *P. infestans*, así como también con tubérculos de la variedad Tuquerreña (material susceptible a gota). Los diferenciales fueron multiplicados mediante esquejes de tallo juvenil (Corzo, 1998). Así mismo, fueron colectadas hojas de 69 plantas de Diacol Monserrate multiplicadas por esquejes de tallo juvenil y suministradas por el Programa Regional Agrícola de la Regional Uno de Corpoica. El material vegetal fue caracterizado con la ayuda de descriptores morfológicos del CIP (Huaman, 1994).

Evaluación de resistencia a *P. infestans*

Recolección de material vegetal. Tres folíolos de hojas sanas completas (Diacol Monserrate y diferenciales de papa, con un mes de desarrollo aproxima-

damente) fueron montados con el envés hacia arriba en cajas de Petri, con papel absorbente humedecido con agua destilada en su interior.

Obtención del inoculo. Se utilizaron los aislamientos de *P. infestans*: 276p, 245L, 87L y H1N (Tabla 1), colectados del altiplano cundiboyacense (municipios de Siecha, Cucunubá, Toca) y Antioquia, facilitados por el grupo de investigación en papa de la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional de Colombia.

Tabla 1. Estado de avirulencia (*Avr*)/virulencia (*avr*) de los aislamientos de *P. infestans*

Aislamiento	Genes <i>Avr</i>	Genes <i>avr</i>
87BL ²	1, 2	3, 4, 7, 11
245L ¹	1, 2	————
276P ¹	1, 2	————
H1N ³	5, 9	1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 10, 11

¹ Genes *Avr/avr* presentes en aislamientos 245L y 276P (Grupo Investigación en papa. Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de Colombia).

² Genes *Avr/avr* presentes en aislamiento 87BL (Méndez, 1998).

³ Genes *Avr/avr*, presentes en aislamiento H1N (Gualtero, 1997).

Activación de la virulencia de aislamientos de *P. infestans*. Para la multiplicación del patógeno, se emplearon los medios de agar-arveja y agar-V8. Luego de tres subcultivos (un subcultivo mensual) de cada uno de los aislamientos, se activó su virulencia mediante la inoculación del patógeno en folíolos de papa Diacol Capiro (muy susceptible a gota); después de una semana aproximadamente, se observaron las lesiones esporulantes y cada trozo de tejido de hoja enfermo se colocó debajo de una rodaja (0.5-1.00 cm de grosor) de papa Tuquerreña (susceptible a gota) previamente desinfectada (hipoclorito de sodio al 2% y etanol al 70%). Al cabo de cinco días se observó el crecimiento del micelio. Este micelio fue nuevamente sembrado en medio de cultivo.

Inoculación. Se preparó una suspensión de esporangios a partir del inoculo contenido en la caja de Petri (10-20 días de crecimiento y patogénicamente activo), al cual se le agregó 1.0 ml de agua destilada; el lavado se filtró para separar el micelio. Se realizó un conteo de esporangios del filtrado mediante el hematocítmetro (mínimo seis conteos). La concen-

tración final de esporangios fue de 4.2 - 5.1 E⁴ esp/ml. En el envés de cada folíolo se aplicó una alícuota de la suspensión (10 µl). Se montaron diez repeticiones para la inoculación con cada uno de los aislamientos. La incubación se realizó a 18 °C con 12 horas diarias de luz y 100% de humedad relativa.

Análisis de la Evaluación de Resistencia a *P. infestans*. La evaluación se realizó cinco días después de la inoculación, donde se observó la presencia o ausencia de genes *R* en el material de papa. Se utilizó Diacol Monserrate como material testigo porque presenta resistencia poligénica y carece de genes *R* (no se empleó *Solanum phureja* como testigo por ser susceptible a gota). Se registró la reacción de compatibilidad (+) o de incompatibilidad (-), teniendo en cuenta el número de folíolos con lesiones esporulantes o no esporulantes respectivamente, por cada una de las diez repeticiones. Se registró una reacción compatible cuando se observó esporulación (del hongo) en al menos dos folíolos. El resultado definitivo de la evaluación de resistencia a *P. infestans* se obtuvo de la moda. Se llevó a cabo un análisis estadístico complementario -Análisis de varianza de dos factores con varias muestras por grupo (Excel-Windows 98) o factorial (aislamientos / materiales de papa)- con respecto al número de folíolos con lesiones esporulantes.

Detección molecular

Extracción de ADN. Se extrajo ADN de los materiales de papa: diferencial 1 (*R1*), diferencial 2 (*R2*), y *S. phureja* fue empleado como control negativo. Nótese que Diacol Monserrate, al poseer resistencia poligénica, no fue empleado como control negativo en esta sección puesto que un QTL de resistencia a *P. infestans* se encuentra ubicado en una región muy cercana al gen *R1* en el cromosoma V de la papa (Gebhardt y Valkonen, 2001). Se evitó el uso de Diacol Monserrate para evitar la presencia de falsos positivos en contraste con los diferenciales de papa 1 (*R1*) y 2(*R2*) en las pruebas moleculares. Por tal motivo se escogió *S. phureja* como control negativo (material susceptible a gota, carece de genes mayores). El aislamiento de ADN genómico se basó en los protocolos de CIP (1998) y Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega).

Procedimiento con PCR para la detección de alelo *R1*. Se realizó PCR con cinco *primers* específicos al alelo *R1* (Tabla 2): GP179 y GP21 (Meksem *et al.*, 1995); 76-2SF2/76-2SR (Ballvora *et al.*, 2002);

SPUD237 (De Jong *et al.*, 1997; Ballvora *et al.* 2002) y Sol 2749-2770F/ Sol 3246-3267R, diseñados a partir de la secuencia del gen R1 (GenBank) en el programa público de Internet Jellyfish versión 2.1 (biowire.com 2000-2002). Los moldes de ADN fueron diferencial 1, diferencial 2 y *S. phureja* (material sin genes mayores, control negativo). Las condiciones de PCR y programación del termociclador para los primers GP179 y GP21 fueron según Meksem *et al.* (1995), para el resto de primers las condiciones y temperaturas para la amplificación fueron ajustadas en este trabajo.

Análisis para la detección del alelo R1. Se realizó electroforesis en gel de agarosa al 1.5-2.0% preparado en buffer TBE 1X teñido con bromuro de etidio (0.3 µg/ml). La presencia o ausencia de la amplificación de los fragmentos fue corroborada en el documentador de geles (SynGene Gene Snap 4.00), así como el peso molecular empleado (escalera de 123 pb y 50 pb para agarosa) en el documentador de geles (SynGene Gene Tools 3.00).

Tabla 2. Secuencias de los primers empleados para la detección del Alelo R1.

		Primers 5' → 3'
GP179	F	GGT TTT AGT GAT TGT GCT GC
	R	AAT TTC AGA CGA GTA GGC ACT
GP21	F	GGT TGG TGG CCT ATT AGC CA
	R	GCT CCA ACA CGG AAG GTT TTC
76-2SF2	F	CACTCGTGACATATCCTCACTA
76-2SR	R	CAACCCTGGCATGCCACG
SPUD237	F	TTC CTG CTG ATA CTG ACT AGA AAA CC
	R	AGC CAA GGA AAA GCT AGC ATC CAA G
Sol 2749-2770	F	CAG GAC CCA AGG AAC AAA TAG A
Sol 3246-3267	R	CGG CAT CAA CAA TAA CAG AAT C

F: Forward; R: Reverse.

Procedimiento con AFLP para la detección del alelo R2. Adaptado del Centro Internacional de la Papa, CIP (1998). El ADN genómico de los materiales de papa, diferencial 1, diferencial 2 y *S. phureja* fue digerido con la enzima Mse/(Invitrogen) en una reacción de 140 µl compuesta por 5 µg de ADN, 10 U enzima MseI y React 1 Buffer 1X (Invitrogen). Se digirió nuevamente cada una de las muestras con la enzima EcoRI (Invitrogen) en una reacción de 200 µl compuesta por 140 µl de solución inicial de digestión enzimática (MseI), 10 U de enzima EcoRI y NaCl 0.1 M.

Se realizó la *ligación de los adaptadores EcoA y MseA* (Invitrogen) al ADN digerido en una reacción de 50 µl: buffer 1X (Invitrogen), 0.1 µM de EcoA, 0.1 µM de MseA, 1 U de T4 ligasa (Invitrogen), 35 µl de ADN digerido. La solución se diluyó 1:4.

Se llevó a cabo la *reacción de pre-amplificación* empleando primers más un nucleótido selectivo. Cada reacción de 20 µl: 1.5 ng de primer Eco + 1 (Gibco BRL), 1.5 ng de primer Mse + 1 (Gibco BRL), 0.2 mM de dNTPs, buffer 1X (Gibco BRL), 5 µl de ADN ligado, amplificada por 0.4 U de taq polimerasa (Invitrogen). La solución se diluyó 1:25. Las reacciones de pre-amplificación fueron sometidas a las condiciones establecidas por el CIP (1998) en el termociclador MJ Research PTC-200.

Por último, se realizó la *reacción de amplificación selectiva*, empleando cinco combinaciones de primers más tres nucleótidos selectivos (primer E + 3 y primer M + 3; Tabla 3): ACC/CAT, ACT/CAC, AGC/CCA, ACT/CGC y ATC/CGA (Invitrogen) reportadas por U *et al.* (1998). Las concentraciones de los primers fueron ajustadas en las reacciones de PCR para que ocurriera la reacción de amplificación, puesto que unos primers provenían de kit comercial (AFLP Analysis System I - Gibco BRL), mientras que otros fueron sintetizados independientemente (Invitrogen). Las cinco combinaciones de primers se amplificaron en un termociclador MJ Research PTC-200, con los ciclos de temperaturas establecidas por el CIP (1998).

Tabla 3. Marcadores AFLP utilizados para la detección del alelo R2.

	Primers 5' → 3'
E-ACC/M-CAT	GAC TGC GTA CCA ATT C/AC C
	GAT GAG TCC TGA GTA A/CA T
E-ACT/M-CAC	GAC TGC GTA CCA ATT C/AC T
	GAT GAG TCC TGA GTA A/CA C
E-AGC/M-CCA	GAC TGC GTA CCA ATT C/AG C
	GAT GAG TCC TGA GTA A/CC A
E-ACT/M-CGC	GAC TGC GTA CCA ATT C/AC T
	GAT GAG TCC TGA GTA A/CG C
E-ATC/M-CGA	GAC TGC GTA CCA ATT C/AT C
	GAT GAG TCC TGA GTA A/CG A

N. D. Primera columna: Nombre sintético. Segunda columna: Secuencia completa de los primers EcoRI y MseI, respectivamente.

Análisis para la detección del alelo R2. Se efectuó electroforesis en gel denaturante de poliacrilamida al 6%-Urea 7M (González *et al.*, 1995), en la cámara de secuenciación Modelo S2 (Gibco BRL). Finalmente, se llevó a cabo la tinción con nitrato de plata (Payne, 1997). Se procedió al reconocimiento visual de la presencia o ausencia de marcadores utilizados en este trabajo tomando como referencia los pesos moleculares obtenidos por Li *et al.* (1998), y fueron comparados con el marcador de peso molecular empleado (escalera de 50 pb para poliacrilamida) en el documentador de geles Syngene Gene Tools 3.00.

RESULTADOS

Evaluación de resistencia a *P. infestans*. Con los aislamientos H1N y 276p, las lesiones esporulantes observadas en los materiales de papa (diferenciales 1 y 2, Diacol Monserrate), correspondieron a una reacción de compatibilidad. El aislamiento HIN produjo la mayor esporulación en todos los materiales (Figura 1).

Fue observada una respuesta hipersensitiva (lesiones necróticas o puntos necróticos sin esporulación) en los diferenciales de papa inoculados con los aislamientos 87BL y 245L. Esta reacción reflejó la presencia de los genes *R1* y *R2* en el hospedante (diferenciales 1 y 2), así como de los genes *Avr1* y *Avr2* en el patógeno (Figura 1).

Se encontró esporulación con todos los aislamientos del patógeno en Diacol Monserrate. No obs-

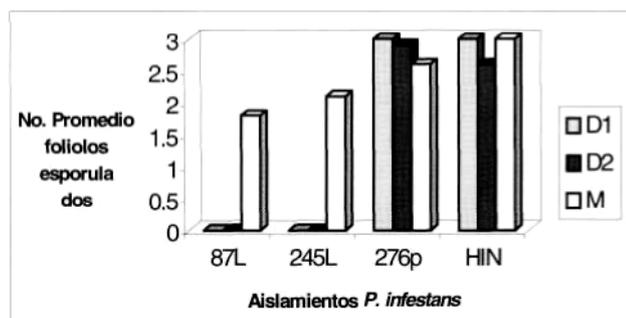


Figura 1. Evaluación de resistencia a *P. infestans* en genotipos tetraploides de papa, basada en la media aritmética del número de folíolos con lesiones esporulantes del total de las repeticiones. Nótese que no hubo folíolos con lesiones esporulantes en los diferenciales 1 y 2 bajo los aislamientos 87L y 245L. La mayor producción de folíolos con lesiones esporulantes ocurrió en los dos diferenciales bajo el aislamiento 276P. Se presentaron folíolos con lesiones esporulantes en Monserrate (testigo), con todos los aislamientos. D1: Diferencial 1, D2: Diferencial 2 y M: D. Monserrate.

tante, esta esporulación fue menor comparada con la esporulación observada en los diferenciales, excepto en el aislamiento HIN, el cual esporuló más abundantemente (Figura 1).

Con respecto al análisis de varianza de dos factores con diversas muestras por grupo o análisis factorial, se determinó que: a) sí hubo diferencia en cuanto al número de folíolos con lesiones esporulantes bajo los cuatro aislamientos ($p < .05$); b) sí hubo diferencia en cuanto al número de folíolos con lesiones esporulantes en los tres materiales de papa ($p < .05$); y c) sí existió interacción del aislamiento y el material en cuanto al número de folíolos con lesiones esporulantes. La combinación de los factores influyó en el número de folíolos con lesiones esporulantes ($p < .05$).

Detección molecular del alelo R1. Con la utilización de los marcadores GP179 y GP21, se visualizaron los fragmentos amplificados de ADN procedentes del diferencial 1. Con relación al marcador de peso molecular utilizado (escalera de 123 pb), la banda que correspondió al fragmento amplificado e iniciado por los primers GP179 (dos bandas), presentó la mayor movilidad electroforética, 550 pb aproximadamente, mientras que la banda correspondiente al fragmento amplificado e iniciado por los primers GP21 fue más pesada, aproximadamente 1230 pb (Figura no mostrada). En los materiales usados como controles negativos (teóricamente no poseen el gen *R1*), es decir, el diferencial 2 y *S. phureja*, también se encontraron las mismas bandas (Figura no mostrada).

En el presente trabajo, con los primers 76-2SF2 / 762SR se obtuvo una banda única con un tamaño de 1353 pb, en relación con el marcador de peso molecular o escalera 123 pb (gel de agarosa al 1.5%), evidenciado en los diferenciales de papa uno y dos, que contienen los genes *R1* y *R2*, respectivamente. El fragmento amplificado estuvo ausente en el material susceptible *S. phureja* (Figura 2).

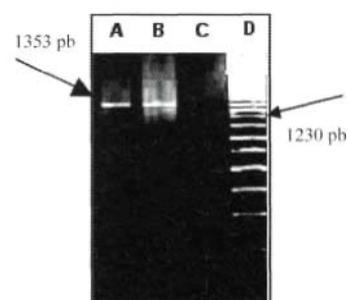


Figura 2. Amplificación por PCR con los primers 76-2SF2/76-2SR en el gel de agarosa al 1.5% en moldes de ADN de: A) Diferencial 1 (fragmento de 1353 pb del gen *R1*); B) Diferencial 2 (fragmento de 1353 pb); C) *S. phureja* (fragmento ausente); y D) marcador de peso molecular, escalera de 123 pb.

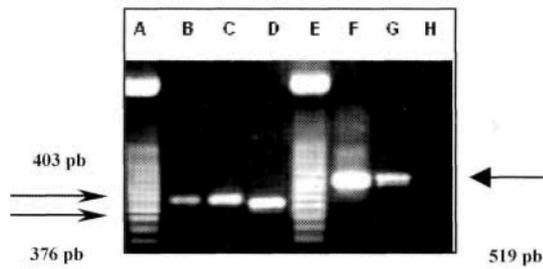


Figura 3. Amplificación por PCR con los *primers* SPUD237 y Sol 2749-2770F / Sol 3246-3267R en gel de agarosa al 1.5%. B-D: amplificación por los *primers* SPUD237 en B: diferencial 1 (403 pb), C: diferencial 2 (403 pb) y D: *S. phureja* (376 pb). F-G: amplificación por los *primers* Sol 2749-2770F/Sol 3246-3267R en F: diferencial 1 (519 pb), G: diferencial 2 (519 pb) y H: fragmento ausente en *S. phureja*. A y E: marcador de peso molecular o escalera de 50 pb.

Con los *primers* SPUD237, se obtuvo un producto de amplificación en los tres materiales con un peso aproximado de 403 pb (Figura 3). Con los *primers* Sol 2749-2770F/Sol 3246-3267R, se evidenció un fragmento de amplificación de 519 pb, en el diferencial 1 y en el diferencial 2; por el contrario, el fragmento estuvo ausente en el material susceptible *S. phureja* (Figura 3).

Detección molecular del alelo R2. Los pesos moleculares citados por Li *et al.* (1998) para cada una de las combinaciones de *primers* son: ACC/CAT-535, ACT/CAC-189, AGC/CCA-369, ACT/CGC-250, ATC/CGA-186. De las cinco combinaciones empleadas en este estudio, se evidenciaron los productos de amplificación de dos combinaciones de *primers*, ACT/CAC y AGC/CCA, cuyos pesos moleculares están muy cercanos a los reportados por Li *et al.* (1998); éstos fueron: 196 pb y 365 pb respectivamente (Figuras 4 y 5), en relación con el marcador de peso molecular o escalera de 50 pb utilizado. Estas bandas se observaron únicamente en el diferencial 2; por el contrario estuvieron ausentes en el diferencial 1 y *S. phureja*. Los marcadores ACT/CAC produje-

ron un fragmento de fuerte tonalidad, mientras que el marcador AGC/CCA produjo un fragmento tenue (Figuras 4 y 5).

DISCUSIÓN

Evaluación de resistencia a *P. infestans*. La expresión fenotípica observada cumple con la teoría del "gen por gen" expuesta por Flor (1971, que no es el objetivo de este trabajo) según la cual un

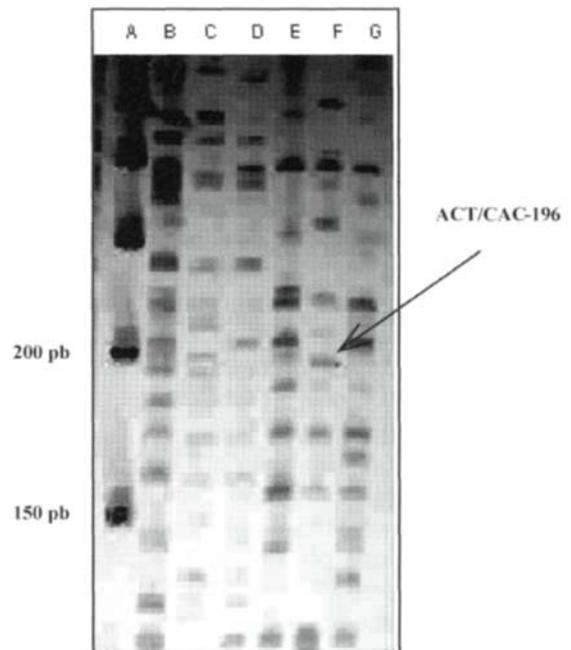
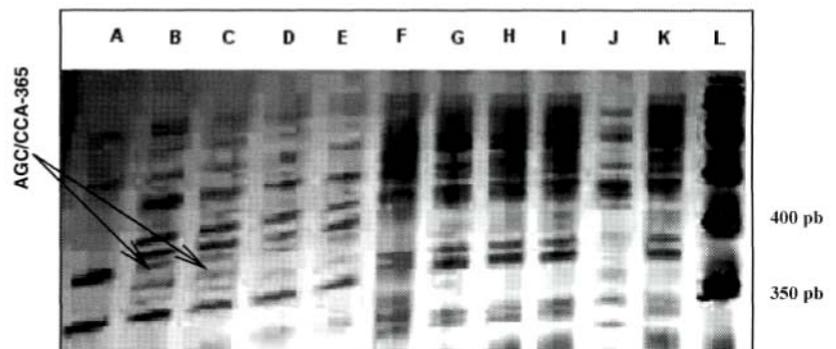


Figura 4. Amplificación de fragmentos generada por marcadores AFLP, en gel de poliacrilamida 6%, úrea 7M (sección). A: marcador de peso molecular o escalera de 50 pb; B-D: fragmentos producidos por la combinación de *primers* ACC/CAT en los materiales de *S. phureja*, diferencial 2 y diferencial 1, respectivamente. E-G: fragmentos originados por la combinación de *primers* ACT/CAC, en los materiales de *S. phureja*, diferencial 2 (obsérvese la flecha que indica la presencia de la banda única en este material con un peso de 196 pb) y diferencial 1, respectivamente.

Figura 5. Amplificación de fragmentos generada por marcadores AFLP, en gel de poliacrilamida 6%, úrea 7M (sección). A-E: fragmentos producidos por la combinación de *primers* AGC/CCA. A: *S. phureja*, - B y C: Diferencial 2 (nótese la flecha que señala la presencia única de un fragmento de peso 365 pb); D y E: diferencial 1; F-I, K: bandas originadas por la combinación de *primers* ACC/CAT; F: *S. phureja*, G y H: diferencial 2; I y K: diferencial 1; J: fragmentos producidos por la combinación de *primers* ATC/CGA en el diferencial 1; L: marcador de peso molecular o escalera de 50 pb.



gen de resistencia *R* en la planta interactúa con un gen de avirulencia (*Avr*) en el patógeno dando lugar a una reacción incompatible que se manifiesta por una respuesta hipersensitiva. Por el contrario, si el patógeno carece del gen *Avr* o la planta carece del gen *R*, la interacción planta-patógeno causa enfermedad.

Del aislamiento 276p se conocía su avirulencia de acuerdo con evaluaciones realizadas por otros investigadores (Tabla 1), pero en este trabajo se demostró que no presenta los genes *Avr 1* y *Avr2*. Es posible que este aislamiento se haya vuelto patogénico para estos genes, teniendo en cuenta que fue colectado de campo y, por tanto, no es monozoospórico.

Las lesiones esporulantes observadas en Diacol Monserrate con todos los aislamientos se explican por la resistencia poligénica de este material (Estrada, 2000; Hodgson, 1961). Esto significa que los genes menores de la planta muestran una fuerte resistencia al patógeno, pero le permiten una ligera esporulación, a excepción del aislamiento HIN, que es una raza muy compleja (Tabla 1).

Es preciso señalar que para evidenciar la presencia de los genes *R1* y *R2*, fueron empleados aislamientos de *P. infestans* mientras que en las investigaciones reportadas por Leonards-Schippers *et al.* (1992), Meksem *et al.* (1995), Li *et al.* (1998) y Ballvora *et al.* (2002), fueron utilizadas razas puras del patógeno. Sin embargo, tanto con los aislamientos de *P. infestans* utilizados de este trabajo (Tabla 1) como con las razas de *P. infestans* se conocía su avirulencia y virulencia.

Se debe clarificar que la técnica de inoculación de *P. infestans* en folíolos desprendidos de papa ha sido útil en investigaciones con *P. infestans* para identificar genes *R* (Leonards-Schippers *et al.*, 1992; Meksem *et al.*, 1995; Li *et al.*, 1998; Ballvora *et al.*, 2002) y que fue el objeto de este trabajo. Pero también ha sido aplicada para determinar la virulencia del patógeno (Jaramillo *et al.*, 1997; Forbes, 1997), cuantificar resistencia parcial en cultivares y clones de papa (Méndez, 1998), identificar aislamientos agresivos de *P. infestans*, probar niveles de infección y respuesta a la concentración de esporangios (Millar *et al.*, 1998).

Se debe tener en cuenta un margen de error en la evaluación de resistencia, puesto que en determi-

nadas ocasiones, en las series de repeticiones de inoculaciones por aislamiento, se observó cierta variación en el número de folíolos esporulados (tres, dos o uno). Esto pudo deberse a que: a) aunque las concentraciones de esporangios utilizadas se encuentren dentro del rango establecido por el CIP (Forbes, 1997), el conteo de esporangios no haya sido exacto; b) se haya presentado precipitación de los esporangios en suspensión, debido a su gran peso, lo cual, pudo haber afectado en el momento de aplicar la gota o inóculo; c) haya habido germinación desigual de los esporangios. Se debe descartar el efecto de las condiciones ambientales, ya que éstas fueron controladas y el material vegetal se recolectó luego de cinco a seis meses de desarrollo de la porción media de las plantas (Tooley, 1990; Stewart, 1990; Hodgson, 1961). No obstante que para contrarrestar el margen de error en este trabajo, se tuvieron en cuenta diez repeticiones de inoculaciones por aislamiento de *P. infestans*, con el fin de tener mayor seguridad en los resultados (moda), conforme con el Grupo de Investigación en papa de la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional de Colombia (Bogotá, D.C.)

Detección molecular de alelo *R1*. Los alelos de los marcadores GP21 y GP179 ligados a *R1*, fueron inespecíficos para la presencia del gen *R1*, pues también fueron encontrados en los genotipos que portan el gen *R2* y genotipos susceptibles.

Estos resultados, equiparados con los resultados de Meksem *et al.* (1995), fueron idénticos en cuanto a la amplificación de fragmentos con estos *primers* en genotipos *R1* y en las variedades susceptibles.

La interpretación a la amplificación de los *primers* GP179 y GP21 en los tres materiales (diferencial 1, diferencial 2 y *S. phureja*), para que sean inespecíficos al alelo *R1*, tiene que ver con la distancia genética a la que se encuentran los dos *primers* específicos respecto del alelo *R1*, ya que, de acuerdo con lo estipulado por Meksem *et al.* (1995) y Ballvora *et al.* (2002), el alelo *R1* está localizado en el intervalo comprendido entre los marcadores GP21 y GP179 en el brazo corto del cromosoma V de la papa. Este intervalo tiene una distancia genética total de 3cM. Así mismo, los marcadores GP21 y GP179 distan genéticamente 2.2 y 0.8 cM del gen *R1*, respectivamente. Estos valores se refieren, a su vez, a la frecuencia de recombinación entre estos segmentos, que es 2.2% y 0.8% (Ballvora *et al.*, 2002).

El resultado con los primers SPUD237 (figura 3) indicó, que éstos no son específicos para el alelo R1, a pesar de que Ballvora *et al.* (2002) afirman que estos marcadores se localizan a 0.1 cM del alelo R1. Sin embargo, De Jong *et al.* (1997) digirieron todos los productos de amplificación con la enzima Alu I y encontraron productos de digestión ligados a resistencia. Por tanto, queda pendiente realizar ese procedimiento para comprobar si esa estrategia funciona con los materiales de este trabajo.

Por tales explicaciones, para que haya mayor especificidad de *primers* y se obtengan datos más confiables en cuanto a la presencia del gen *R1*, es indispensable que los marcadores se localicen a una distancia genética más cercana al gen *R1*. Según esto, y conforme a los nuevos hallazgos reportados por Ballvora *et al.* (2002), fueron implementados nuevos *primers* específicos al gen *R1*, denominados 76-2SF2/76-2SR, los cuales amplificaron un fragmento del gen *R1* (figuras 2 y 6).

El resultado con los *primers* Sol 2749-2770F/Sol 3246-3267R fue idéntico al encontrado con los *primers* 76-2SF2/76-2SR, salvo por el peso molecular de los fragmentos (519 pb y 1353 pb, respectivamente). Es de gran importancia anotar que estos dos tipos de marcadores no se encuentran ligados al gen *R1*, sino que amplifican secuencias del gen *R1*. El tamaño del fragmento de amplificación producido por ambos primers en el diferencial 1 fue corroborado con el Programa Jellyfish (figura 6).

Estos resultados son, por tanto, consistentes con los obtenidos por Ballvora *et al.* (2002), en cuanto al fragmento amplificado por los primers 76-2SF2/76-2SR y Sol 2749-2770F/Sol3246-3267R, pues estuvo presente en los materiales que contienen el gen *R1* y estuvo ausente en los materiales susceptibles que no poseen el gen *R1*. No obstante, el fragmento amplificado estuvo presente en el diferencial 2 (*R2*). Este resultado indica que estos marcadores no hacen distinción entre los diferentes genes mayores, lo cual sugiere que debe existir cierta homología entre las secuencias de estos genes. Lo

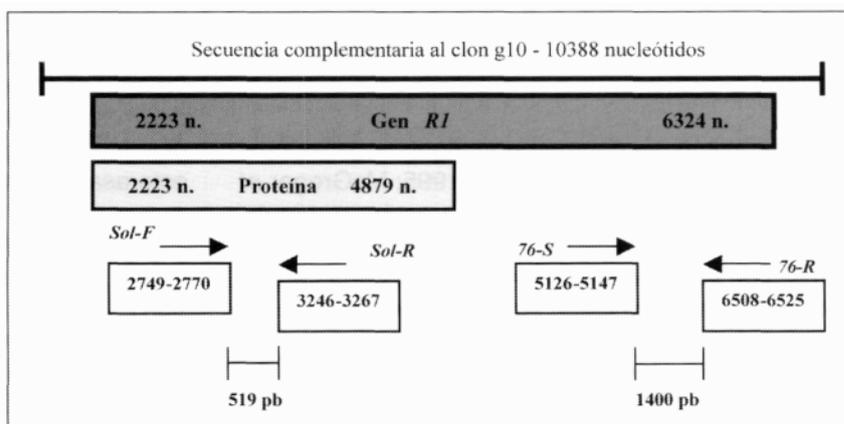


Figura 6. Esquema que ilustra la región donde se localizan los *Primers* Sol 2749-2770F/Sol 3246-3267R y 76-2SF2/76-2SR y generan un Fragmento de amplificación del Gen *R1*, según el Programa Jellyfish (biowire.com 2000-2002). Dentro de la secuencia complementaria al clon g10 (10388 nucleótidos) se ubica la secuencia del gen *R1* (Ballvora *et al.* 2002). El fragmento amplificado por los *primers* SolF/SolR se encuentra en la región donde se codifica la proteína del gen *R1*. El fragmento generado por los primers 76F/76R se encuentra dentro y fuera de la secuencia del gen *R1*.

confirma el artículo de Ballvora *et al.* (2002), donde dice que el gen *R1* (secuencia complementaria al clon g10) presentaba secuencias similares (marco abierto de lectura) con genes de resistencia de otras plantas. Se requiere realizar estudios complementarios de las secuencias de los diferenciales para comprobar si existe similitud entre éstas, por ejemplo secuenciación, hibridación Southern, Northern, Western y Elisa, para comprobar si existe similitud entre las secuencias de estos genes.

Detección molecular de alelo R2. En cuanto al reconocimiento visual de las bandas respectivas, se puede afirmar que fue posible gracias a la detección no radiactiva o tinción con nitrato de plata (Payne, 1997). Sin embargo, se percibió una gran variación entre cada una de las tinciones realizadas, por lo que se debería implementar en próximos estudios detección radiactiva o detección quimioluminiscente.

Los dos marcadores ACT/CAC-189 y AGC/CCA-369, reconocidos visualmente (figuras 4 y 5), reiteran la validez del mapa consenso construido por los investigadores Li *et al.* (1998), salvo por la combinación ATC/CGA-186, que no fue encontrada en este estudio. Esto último quizá se debe a que los mapas de ligamiento y de consenso están basados en poblaciones de papa producidas en los países bajos (Bélgica, Holanda y Luxemburgo) y exista la posibilidad de que tal marcador no sea tan específico al *R2* en los materiales nacionales, posiblemente

te por variación genética. De todas formas, el uso de este marcador podría verificarse mediante detección radiactiva.

Por último, se demostraron algunas de las propiedades de los AFLP (Vos *et al.*, 1995; McGregor *et al.*, 2000). En primer lugar son una herramienta molecular de alta eficiencia pues se genera un gran número de fragmentos polimórficos por cada combinación; en segundo lugar, son reproducibles.

Marcadores moleculares como método de identificación de genes de resistencia *R1* y *R2*.

Es muy evidente que los resultados indicaron una correspondencia fenotípica y genotípica en cuanto a la presencia de los genes *R1* y *R2* en los diferenciales de papa mediante la presencia de los marcadores ligados a estos genes de resistencia (ACT/CAC-189 y AGC/CCA-369 ligados a *R2*; los marcadores 76-2SF2/76-2SR y Sol 2749-2770F/Sol3246-3267R específicos al gen *R1*), en referencia a la respuesta hipersensitiva encontrada en los genotipos de papa *R1* y *R2* hacia los aislamientos de *P. infestans* 245L y 87BL

Conforme a lo referido anteriormente, se observó una gran similitud entre el diferencial 1 y el diferencial 2 no sólo en el aspecto fenotípico, donde la respuesta hipersensitiva hacia los aislamientos 87BL y 245L fue la misma, sino también en el molecular. Primero, el producto de amplificación dado por los primers específicos 76-2SF2/76-2SR y Sol 2749-2770F/Sol3246-3267R en el diferencial 1, se presentó en el diferencial 2; segundo, los fragmentos producidos en los dos diferenciales en cada una de las combinaciones de marcadores AFLP utilizadas fueron muy similares entre sí.

El asunto en cuestión plantea la posibilidad de que alguno de estos genes haya evolucionado (lo cual explica que sean diferenciales) y que algunas de las secuencias se hayan conservado, como puede ser el caso de los motivos de proteína (García-Mas *et al.*, 2001), tomando en consideración que estos genes provienen de plantas silvestres (*S. demissum*). Cuando se trabajó con el material vegetal, se emplearon descriptores morfológicos (Huaman, 1994) y el ítem de floración no se tuvo en cuenta (carácter de gran valor taxonómico), pues el material se colectó antes de esta etapa. Por tal razón es pertinente realizar estudios complementarios; por ejemplo, secuenciación de los fragmentos amplificados ligados a cada uno de

los genes, hibridación de la secuencia del gen *R1* [secuencia disponible en el GenBank (Ballvora *et al.*, 2002)] con la secuencia del *R2* para comparar estos dos materiales en el nivel molecular, además de estudios bioquímicos como electroforesis de proteínas y esterases (Contreras 1999).

En el presente estudio (aunque no era el objetivo del trabajo) se evidenció el concepto de *gen por gen* (Flor, 1971; Agrios, 1997) con la presencia de los marcadores ligados al alelo *R2* (ACT/CAC-189 y AGC/CCA-369) y marcadores específicos para el alelo *R1* (76-2SF2/76-2SR y Sol 2749-2770F/Sol3246-3267R) en referencia a 1) la reacción de compatibilidad entre el material de papa *R1-R2* y los aislamientos 276P-HIN; 2) la respuesta hipersensitiva encontrada entre los genotipos de papa *R1-R2* y los aislamientos 245L-87BL. Pese a que los aislamientos de *P. infestans* exhibieron similar morfología macroscópica y microscópica, y de acuerdo con Gualtero (1997), los aislamientos estudiados aquí, y otros más, fueron homogéneos para la enzima glucosa-6-fosfato isomerasa y para proteínas solubles. Sus respuestas variaron ante su inoculación en los materiales de papa. Por último, por razón del análisis factorial comentado, se verificó que sí existió interacción entre cada uno de los aislamientos y los diferenciales de papa en cuanto al número de folíolos con lesiones esporulantes.

Para tener la absoluta certeza de que los genes *R1* y *R2* están presentes en los materiales de papa respectivos, aunque los resultados lo confirmen (prueba biológica y marcadores alélicos específicos), se necesita estudiar la expresión génica de estos, lo cual significa que se deben establecer cruzamientos entre materiales resistentes y susceptibles con el fin de evidenciar la segregación de los alelos de resistencia.

Estos resultados implican que, si se comprueba la expresión de los genes de resistencia en la población segregante, se justifica la aplicación inmediata de los marcadores moleculares estudiados, en la selección de plantas que contienen genes de resistencia a *P. infestans* para fitomejoramiento (selección asistida por marcadores moleculares), dirigido a los distintos materiales de papa colombianos, sobre todo en los materiales con excelente calidad industrial pero que son *susceptibles* y *altamente susceptibles* a *P. infestans*. Para el primer caso se encuentran parda pastusa, yema de huevo o criolla, y tuquerreña o sabanera; para el segundo caso se habla de Diacol Capiro (Núñez, 1999).

CONCLUSIONES

Se determinó la presencia de genes *R1* y *R2* en los diferenciales de papa 1 y 2 mediante la respuesta hipersensitiva observada bajo los aislamientos 87BI y 245L de *P. infestans*.

Se demostró la presencia del alelo *R1* mediante los marcadores específicos 76-2SF2/76-2SR (Ballvora *et al.*, 2002) y Sol 2749-2770F/Sol3246-3267R (Jellyfish).

Se determinó la presencia del alelo *R2* mediante los marcadores específicos AFLP ACT/CAC y AGC/CCA (Li *et al.*, 1998).

Se encontró una correspondencia fenotípica y genotípica en cuanto a la presencia de los alelos *R1* y *R2* en los diferenciales de papa 1 y 2, respectivamente. Así mismo, se evidenció el concepto de *gen por gen*, expuesto por Flor (1971).

Sería deseable realizar estudios complementarios de las secuencias de los diferenciales para comprobar si existe similitud entre éstas; por ejemplo, secuenciación, hibridación Southern, Northern, Western y Elisa. Por otro lado, se debería implementar detección radiactiva o detección quimioluminiscente para la técnica de AFLP en los próximos estudios para facilitar la visualización de las bandas.

Los resultados del presente trabajo son de gran importancia para el estudio y control de la gota de los cultivos de papa en las zonas productoras de Colombia. La identificación de los genes que confieren resistencia a *P. infestans* mediante tecnología molecular permitirá desarrollar, con mayor eficiencia, programas de mejoramiento genético que beneficien de manera directa los rendimientos de los cultivos, en especial los de mayor interés industrial para nuestro país.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a Christiane Gebhardt, líder de Investigación asociada al Instituto Max Planck para el Mejoramiento de los Cultivos (Colonia-Alemania), por la comunicación oportuna de sus más recientes publicaciones aplicadas en este trabajo.

BIBLIOGRAFÍA

- Agrios, G. N. 1996. *Fitopatología*. México D. R: Editorial Limusa, S. A.
- Ballvora, A.; Ercolano, M.R.; Weib, J.; Meksem, K.; Bormann, A.; Oberhagemann, R.; Salamini, F.; Gebhardt, C. 2002. The *R1* Gene for Potato Resistance to Late Blight (*Phytophthora infestans*) Belongs to the Leucine Zipper/NBS/LRR Class of Plant Resistance Genes. *The Plant Journal*, 30(3): 361-371.
- Carvajal, G. H.; Abaunza, C. A.; Coronel, B.; Pinzón, L. M. 2000. Aspectos generales del cultivo de la papa y sus sistemas de producción en Colombia. En *Manejo Integrado de la Papa. Manual Técnico*. Corpoica. Pp. 19-38.
- Centro Internacional de la Papa (CIP). 1998. Protocolos de laboratorio de Biología Molecular. Tipificación genética. Ghislain, M.; Zhang, D.; Herrera, M. R. (Eds.). Manual de Capacitación. Segunda edición (revisado octubre de 1998). Lima: Departamentos de Recursos Genéticos.
- Corzo, C. P. 1998. Curso-Taller Producción de Semilla de Papa con Alta Calidad Sanitaria por Medio de Esquejes. *Memorias*. Corpoica-Sena.
- Day, P. R. 1974. The Gene For Gene Concept. In: *Genetics of Host-Parasite Interaction*. San Francisco: W. H. Freeman and Co., pp. 92-110.
- De Jong, W.; Forsyth, A.; Leister, D.; Gebhardt, C; Baulcombe, D. C. 1997. A Potato Hypersensitive Resistance Gene Against Potato Virus X Maps to A Resistance Gene Cluster on Chromosome 5. *Theor Appl Genet*, 95: 246-252.
- Del Valle, A. 1997. La Gota. *Revista Papa*. Órgano Informativo de Fedepapa, (17): 3.
- Estrada, R. N. 2000. La biodiversidad en el mejoramiento genético de la papa. La Paz: CIP-IRGRI-PRACIPA-IBTA-PROINPA-COSUDE-CID, pp. 159-183.
- Flor, H.H. 1971. Current Status of the Gene-For-Gene Concept. *Ann. Rev. Phytopathol*, 9: 275-296.
- Forbes, A. G. 1997. Manual for Laboratory Work on *Phytophthora infestans*. Quito: Centro Internacional de la Papa, CIP Training Manual.
- García-Mas, J.; Leeuwen, H. V.; Monfort, A.; Carmen de Vicente, M.; Puigdomenech, P.; Arus, P. 2001. Cloning and Mapping of Resistance Gene Homologues in Melon. *Plant Science*, 161: 165-172.
- Gebhardt, C; Valkonen, J. P. T. 2001. Organization of Genes Controlling Disease Resistance in the Potato Genome. *Annu. Rev. Phytopathol*, 39: 79-102.
- González, D. O.; Palacios, N.; Gallego, G.; Tohme, J. 1995. Protocolos para marcadores moleculares. Cali: Unidad de Investigación de Biotecnología, Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT).
- Gualtero, E. J. 1997. Caracterización aloenzimática de poblaciones de *P. infestans* en papa en el altiplano cundiboyacense de los Andes de Colombia. *Tesis de Maestría*. Bogotá D. C: Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Agronomía,
- Hardy, B., Trognitz, B.; Forbes, B. 1996. Mejoramiento para el Tizón Tardío: progresos hasta hoy. En *Papas colombianas con el mejor entorno ambiental*. Robayo, G.

- Henfling, J. W. 1987. El Tizón Tardío de la papa: *Phytophthora infestans*. *Boletín de Información Técnica* 4. Segunda Edición. Lima: Centro Internacional de la Papa (CIP).
- Hodgson, W. A. 1961. Laboratory Testing of the Potato for Partial Resistance to *Phytophthora infestans*. *American Potato Journal*, 38: 259-264.
- Huaman, Z. 1994. Descriptores de la Papa para caracterización básica de colecciones nacionales. Lima: CIP.
- Jaramillo S.; Patino L.F.; López J.B.; Buriticá P.; Márquez M.E.; Zapata J.L.; Morales J.G. 1997. Historia y origen del Pato sistema *Phytophthora infestans/Solanum*. Una Revisión. En: IV Foro de Sanidad Vegetal y Primer Seminario Nacional sobre Gota de la Papa. Grupo de Sanidad Vegetal, Grupo de Biotecnología, Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín, pp. 1-15.
- Leonards-Schippers, C.; Giefers, W.; Salamini, F.; Gebhardt, C. 1992. The *R1* Gene Conferring Race-Specific Resistance to *Phytophthora infestans* in Potato is Located on Potato Chromosome V. *Mol. Gen. Genet.*, 233: 278-283.
- 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.
- Malcolmson, J.F.; Black, W. 1966. New *R* Genes in *Solanum demissum* Lindl and their Complementary Races of *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary. *Euphytica*, 15: 199-203.
- Mcgregor, C.E.; Lambled, C.A.; Greyling, M.M.; Louw, J.H.; Warnich, L. 2000. A Comparative Assessment of DNA Fingerprinting Techniques (RAPD, ISSR, AFLP and SSR) in Tetraploid Potato (*Solanum tuberosum* L.) Germplasm. *Euphytica*, 113: 135-144.
- Meksem, K.; Leister, D.; Peleman, J.; Zabeau, M.; Salamini, F.; Gebhardt, C. 1995. A High-Resolution Map of the Vicinity of the *R1* Locus on Chromosome V of Potato Based on RFLP and AFLP Markers. *Mol. Gen. Genet.*, 249: 74-81.
- Méndez, S. M. J. 1998. Cuantificación de componentes de resistencia a *P. infestans* en 78 genotipos de papa provenientes del Proyecto de Mejoramiento por Resistencia Parcial a Gota del Instituto Colombiano Agropecuario (ICA). *Tesis de Pregrado*. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Agronomía.
- Miller, J. S.; Johnson, D. A.; Hamm, P. B. 1998. Aggressiveness of Isolates of *Phytophthora infestans* from the Columbia Basin of Washington and Oregon. *Phytopathology* 88: 190-197.
- Payne, S. 1997. Microsatellite Analysis. In: *Detection of Mutations and Polymorphisms in DNA*. Crc Press, pp. 31-44.
- Ribaut, J-M; Hoisington, D., 1998. Marker-Assisted Selection: New Tools And Strategies. *Trends in Plant Science* 3(6): 236-239.
- Stewart, H. E. 1990. Effect of Plant Age and Inoculum Concentration on Expression of Major Gene Resistance to *Phytophthora infestans* in Detached Potato Leaflets. *Mycological Research*, 94 (6): 823-826.
- Tooley, P. W. 1990. Variation in Resistance to *Phytophthora infestans* among 21 *Solanum verrucosum* Plant Introductions. *American Potato Journal*, 67(8): 491-498.
- Vanderplank, J. E. 1984. Horizontal and Vertical Resistance. In: *Disease Resistance in Plants*. Second edition. Orlando Academic Press.
- Vos, R; Hogers, R.; Bleeker, M.; Reijans, M.; Van Der Lee, T.; Hornes, M.; Frijters, A.; Pot, J.; Peleman, J.; Kuiper, M.; Zabeu, M. 1995. AFLP: A New Concept for DNA Fingerprinting. *Nucleic Acid Research*, 23(21): 4407-4414.
- Watanabe, J. A. y Watanabe, K. N. 2000. Pest Resistance Traits Controlled by Quantitative Loci and Molecular Breeding Strategies in Tuber-Bearing *Solanum*. *Plant Biotechnology* 17(1): 1-16.
- Young, N. D. 1996. QTL Mapping and Quantitative Disease Resistance in Plants. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 34: 479-501.
- Zapata, J. L. 2000. Manejo integrado de las enfermedades de la papa. En: *Manejo Integrado de la Papa. Manual Técnico*. Corpoica, pp. 130-140.

Recursos electrónicos

Biowire.Com (2000-2002). Labvelocity (2002). Jellyfish. Simple, Practical Gene Analysis (Versión 2.1).

<<http://www.biowire.com>>

Contreras, A. 1999. Botánica de la papa. Identificación de Variedades y Genotipos de la Papa. Pautas Quimiotaxonómicas. Universidad Austral de Chile. Facultad de Ciencias Agrarias. Instituto de Producción y Sanidad Vegetal.

<<http://www.agrarias.uach.cl/webpapa/mpapa.html>>

Ñustez, C. E. 1999. *Phytophthora infestans*: Situación en Latinoamérica. Universidad Nacional de Colombia. <<http://redepapa.org/patologiared.html>>.